

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZA DEL FARMACO**  
**XXI CICLO**



**OTTIMIZZAZIONE DELLE PROCEDURE DI SINTESI**  
**PEPTIDICA E PEPTIDOMIMETICA MEDIANTE**  
**MICROONDE**

**Dr. Claudio Aquino**

**Tutor:**

**Ill.mo Prof.**

**Ettore Novellino**

**Coordinatore:**

**Ill.ma Prof.ssa**

**Maria Valeria D'Auria**

# INDICE

1. INTRODUZIONE	Pag. 3
2. SINTESI ETEROCICLICA	Pag. 10
2.1 NEOPLASIE	Pag. 11
2.2 RISULTATI E DISCUSSIONI	Pag. 18
2.2.1 CHIMICA	Pag. 18
2.3 CITOTOSSICITA' IN VITRO	Pag. 28
2.3.1 SERIE III	Pag. 28
2.3.2 SERIE IV	Pag. 36
3. SINTESI PEPTIDOMIMETICA	Pag. 41
3.1. PEPTIDOMIMETICI	Pag. 42
3.2 CHIMICA	Pag. 49
3.2.1 $\beta$ -IODOAMMINE	Pag. 49
3.2.2 LATTAME DI FREIDINGER	Pag. 50
3.2.3 LEGAME AMINOMETILENICO	Pag. 53
4. SINTESI PEPTIDICA	Pag. 58
4.1 SINTESI PEPTIDICA IN FASE SOLIDA	Pag. 59
4.2 MORBO DI ALZHEIMER E PEPTIDE $\beta$ -AMILODE	Pag. 61
4.3 CHIMICA	Pag. 66
5. CONCLUSIONI	Pag. 75
6. PARTE SPERIMENTALE	Pag. 77
7. BIBLIOGRAFIA	Pag. 103

## **1.INTRODUZIONE**

Il crescente sviluppo della biologia molecolare ha determinato nel campo della chimica farmaceutica un aumento considerevole della domanda di nuove molecole attive e, di conseguenza, dell'utilizzo e sviluppo di nuovi metodi sintetici e di purificazione che possano soddisfare tale richiesta

Un posto di primo rilievo spetta sicuramente all'applicazione delle microonde per il riscaldamento di reazioni che necessitano di una maggiore immissione di energia. Sin dal primo lavoro di *Gedye*<sup>1</sup> che descrive l'utilizzo ed i vantaggi del riscaldamento delle reazioni organiche mediante microonde, pubblicato nel 1986 sulla rivista *Tetrahedron*, il loro utilizzo nella sintesi organica si sta diffondendo moltissimo in questi ultimi anni, dimostrandosi una tecnica di grandissimo valore per la chimica farmaceutica ed il drug discovery, per la notevole riduzione dei tempi di reazione, passando, di solito, dai giorni o ore ai minuti o secondi.<sup>2</sup> Librerie di composti, quindi, possono essere rapidamente sintetizzati in modo sia parallelo che sequenziale, permettendo un uso più efficiente di risorse costose e limitate, ed uno studio più veloce della structure-activity relationship (SAR).<sup>3</sup>

Inoltre le microonde spesso facilitano la scoperta di nuove tipologie di reazioni, in quanto le drastiche condizioni di reazioni raggiungibili dal riscaldamento mediante microonde, a volte, portano a reattività inusuale che non può essere duplicata con il riscaldamento convenzionale.<sup>4</sup>

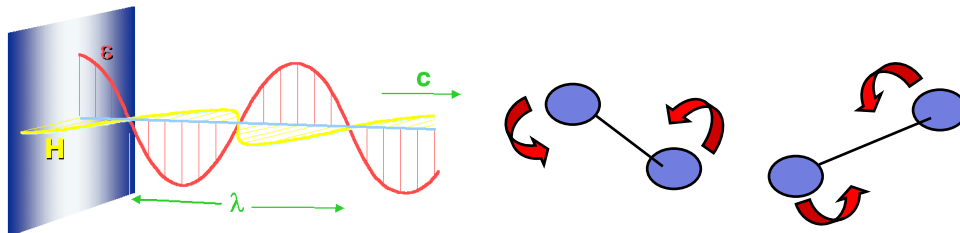
Le microonde sono radiazioni elettromagnetiche non ionizzanti che coprono l'intervallo di frequenza da 300 MHz a 300 GHz, comprese tra le radioonde e l'infrarossi. Le microonde sono caratterizzate da livelli di energia del fotone inferiori di diversi ordini di grandezza delle energie di dissociazione dei legami chimici covalenti, ionici, ad idrogeno e persino delle deboli interazioni di Van der Waals. Ciò escluderebbe la possibilità di un intervento diretto delle microonde nelle reazioni di sintesi chimica che presuppongono la rottura o l'indebolimento di legami interatomici, anche se nella pratica si è visto nella maggior parte dei casi un netto miglioramento delle rese ed una diminuzione dei tempi di reazione.

L'irradiazione mediante microonde, invece, produce un riscaldamento interno efficace per trasferimento diretto dell'energia delle microonde alle molecole polari,<sup>5</sup> per esempio solventi, reagenti e catalizzatori, che sono presenti nella miscela di reazione.

La sintesi organica assistita da microonde (*microwave-assisted organic synthesis*, **MAOS**) si basa, soprattutto, sugli effetti del riscaldamento dielettrico,<sup>6,7</sup> dovuto alla componente del campo elettrico delle microonde, che dipende dall'abilità di un materiale specifico di assorbire l'energia delle microonde e di convertirla in calore. Questo riscaldamento può avvenire mediante due meccanismi:

- polarizzazione dipolare
- conduzione ionica.

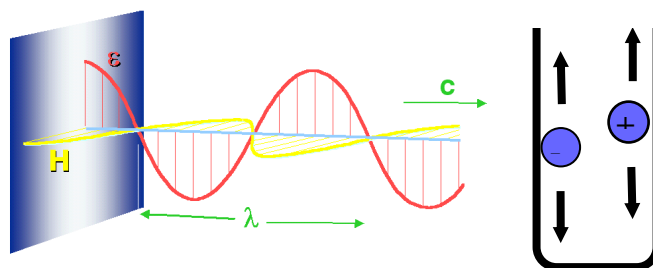
Mentre i dipoli nella miscela di reazione, come le molecole di un solvente polare, sono coinvolti nell'effetto della polarizzazione dipolare; le particelle cariche, come gli ioni, sono influenzate dalla conduzione ionica. Quando irradiati con microonde, i dipoli del campione si allineano secondo il campo elettrico applicato. Poiché il campo applicato oscilla, i dipoli cercano di riallinearsi con il campo elettrico alternante ed, in questo movimento, l'energia è persa sotto forma di calore mediante frizione molecolare e perdita dielettrica. La quantità di calore generata da questo processo è direttamente legata alla capacità della matrice di allinearsi con la frequenza del campo applicato.



**Figura 1** Dipoli sottoposti a radiazione elettromagnetica

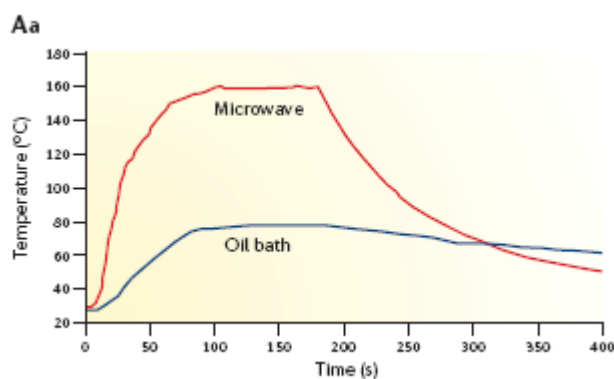
Se il dipolo non ha tempo a sufficienza per allinearsi, o si riorienta troppo velocemente con il campo applicato, non avviene nessun riscaldamento. La frequenza di 2.45 GHz, usata in tutti i sistemi commerciali, permette alle molecole dipolari di allinearsi in tempo ma non di seguire il campo alternante in modo preciso.

In una soluzione contenente ioni, questi ultimi si muovono attraverso la soluzione sotto l'influenza del campo elettrico applicato, che determina un aumento della velocità di collisione con conversione della energia cinetica in calore.



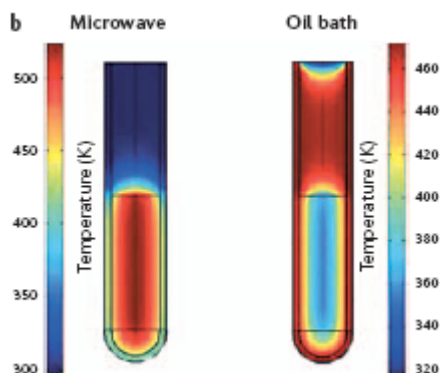
**Figura 2.** Ioni sottoposti a radiazione elettromagnetica

Mettendo a confronto il riscaldamento con l'ausilio delle microonde con quello tradizionale mediante bagnetto ad olio, si può osservare, nel primo caso, un rapido aumento della temperatura di reazione, in modo particolare se si usa un reattore ermeticamente sigillato.



**Figura 3** Differenza dei profili delle temperatura di un campione di 5 ml di etanolo (punto di ebollizione di 78°C) riscaldato in un vessel sigillato con irradiazione di microonde di tipo single-mode e mediante bagnetto ad olio in vessel aperto.

Inoltre mentre per il bagnetto ad olio, il calore è trasferito per conduttanza e, quindi, il trasferimento di energia dipende dalla conduttività termale dei vari materiali che devono essere attraversati con conseguente temperatura del reattore maggiore di quella della miscela di reazione; per il riscaldamento mediante microonde, il gradiente di temperatura risulta invertito all'interno della miscela di reazione in quanto i reattori utilizzati sono costituiti solitamente da materiali trasparenti a queste radiazioni.<sup>8</sup>



**Figura 4** Gradiente di temperatura invertito nel riscaldamento mediante microonde rispetto a quello tradizionale mediante bagnetto ad olio.

Sembra, quindi, che nella maggior parte dei casi questi miglioramenti siano dovuti a semplici effetti termici/cinetici descritti da Arrhenius, secondo cui la resa di una reazione chimica aumenta con l'innalzamento della temperatura ( $k = A e^{-E_a/RT}$  dove  $k$  rappresenta la velocità con cui la reazione chimica avviene,  $A$  è il fattore di frequenza (costante),  $E_a$  l'energia di attivazione,  $R$  la costante dei gas e  $T$  la temperatura). Tuttavia, spesso si trovano discordanze tra reazioni sotto microonde ed in condizioni standard, a causa dei cosiddetti “microwave effects”, cioè effetti che non possono essere raggiunti e duplicati dal riscaldamento convenzionale, ma che sono comunque attribuiti essenzialmente ad effetti termici.<sup>9,10</sup>

Sebbene molti dei primi esperimenti pionieristici di questa nuova tecnica erano condotti in forni a microonde tipo da cucina<sup>1,11</sup>, oggi sono disponibili numerosi strumenti specializzati per la sintesi chimica. Tutti questi reattori commercialmente disponibili hanno alcune caratteristiche comuni, come meccanismi di agitazione per la reazione, diretto controllo della temperatura mediante fibre ottiche o sensori infrarossi e software che permettono di controllare temperatura e pressione regolando l'immissione delle microonde.

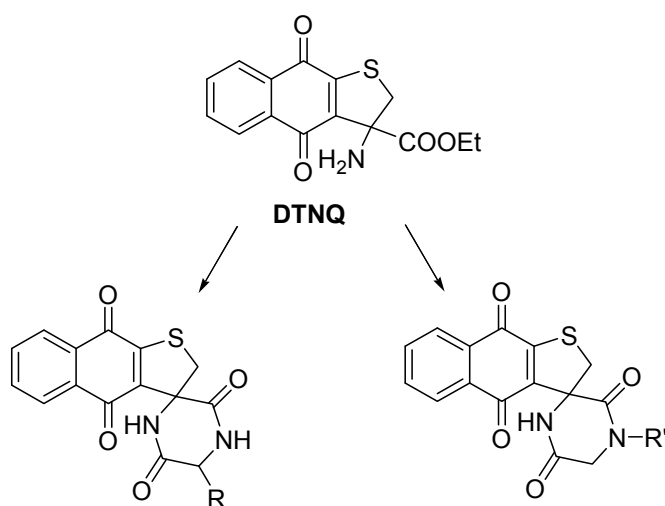
Attualmente, si stanno sviluppando due modelli di reattori per microonde: *multimode* e *monomode* (detto anche *single-mode*).

In uno strumento multimode, simile a quelli per uso domestico, le microonde entrano in una cavità solitamente grande (circa 40-50 litri) e si riflettono sulle pareti della cavità, interagendo quindi con il campione in modo caotico. Nello strumento singlemode, la cavità è molto più piccola e l'irradiazione elettromagnetica è diretta, tramite opportune guide di tipo rettangolare o circolare, sul *vessel* di reazione che è montato ad una distanza fissa dalla

fonte delle microonde. Nel contesto del drug discovery, c'è una differenza chiave tra i due sistemi: nella cavità multimode possono essere irradiati simultaneamente diversi vessel di reazione, al contrario, nel single-mode può essere irradiato un solo vessel. Molte compagnie di strumentazioni per le microonde offrono un'ampia gamma reattori con diversi grado di automazione, database, sicurezza, monitoraggio della temperatura e della pressione, e design.

L'utilizzo delle microonde nella sintesi organica è applicabile ad un gran numero di reazioni organiche, soprattutto quelle che richiedono calore, rendendole più veloci e fornendo rese più elevate e mentre all'inizio questa tecnica veniva applicata solo quando si incontravano step di reazione lenti e difficili, oggi l'approccio sta progressivamente cambiando e le microonde vengono utilizzate, non più come "ultima risorsa", ma anzi come prima scelta nell'eseguire reazioni organiche.<sup>12</sup>

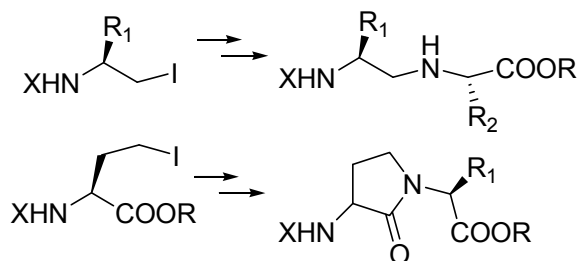
Durante la mia esperienza di dottorato di ricerca mi sono occupato di sintesi eterociclica, peptidica e peptidomimetica, supportata mediante la tecnica delle microonde. In particolar modo mi sono interessato della sintesi di due serie di composti a natura chinonica ad azione antitumorale, che presentano, come struttura base, il sistema 3-amino-3-etossicarbonil-2,3-diidrotieno[2,3-*b*]nafto-4,9-dione (DTNQ), coniugato a catene laterali di natura aminoacidica per la prima serie, e catene presentanti diversi gruppi funzionali per la seconda, tramite un anello dichetopiperazinico.



**Figura 5** Strutture della DTNQ e dei suoi derivati dichetopiperazinici



La parte peptidomimetica ha riguardato la sintesi di strutture  $\beta$ -turn e di isosteri del legame peptidico, come il legame aminometilenico  $\psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ , a partire da nuovi building blocks, rappresentati da iododerivati di aminoacidi.



**Figura 6** Applicazione degli aminoacidi iododerivati per la sintesi di strutture  $\beta$ -turn e del legame aminometilenico  $\psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ ,

Infine mi sono interessato dell'ottimizzazione della sintesi in fase solida mediante microonde di peptidi caratterizzati da difficile sequenza sintetica, quale ad esempio il  $\beta$ -amiloide, noto componente di aggregati neuronali probabilmente coinvolti nella genesi del morbo di Alzheimer.

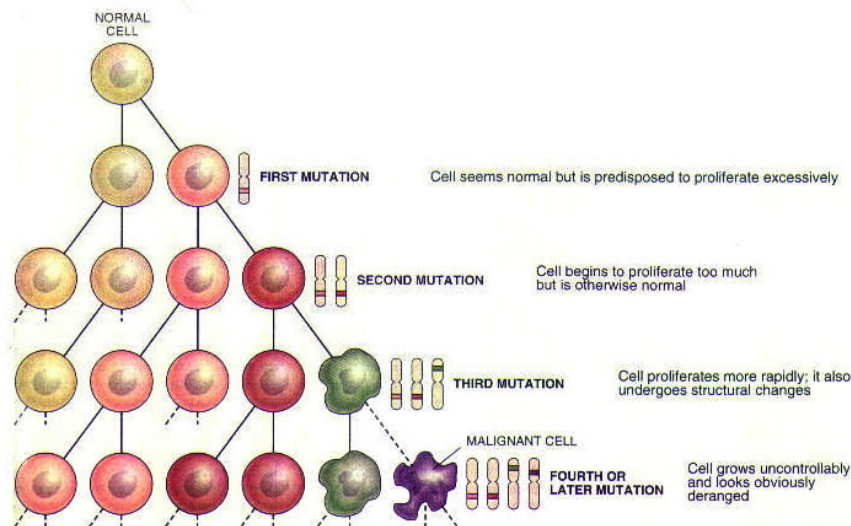
**DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA**

**Figura 7.** Sequenza del peptide  $\beta$ -amiloide (1-42)

## **2. SINTESI ETEROCICLICA**

## 2.1 NEOPLASIE

Le neoplasie rappresentano una classe di malattie caratterizzata da una incontrollata proliferazione di alcune cellule dell'organismo, che si rendono indipendenti dai meccanismi fisiologici di controllo cellulare a seguito di danni a carico del loro patrimonio genetico. Tutte le cellule cancerose e precancerose presentano, infatti, alterazioni molto estese del loro assetto cromosomico (cariotipo). Questa osservazione rappresenta la base su cui si è sviluppata la teoria dei tumori come "malattie cromosomiche". Tale ipotesi al giorno d'oggi è avvalorata da numerosissime evidenze sperimentali e non ultima dalla considerazione che la maggior parte delle sostanze cancerogene siano anche mutagene. Statisticamente si stima che per la manifestazione del fenotipo neoplastico occorranzo dalle cinque alle sette mutazioni a carico della stessa cellula a seconda dell'origine ematologica o epiteliale/mesenchimale. In ogni modo, tale numero di mutazioni è estremamente elevato se si considera la frequenza media di mutazione, pari a circa  $2 \times 10^{-7}$ , ulteriormente ridotta dalla presenza di meccanismi di protezione e riparazione del genoma. L'alterazione cromosomica delle cellule tumorali è talmente grave ed estesa da fornire la prova che in ogni forma di tumore tutte le cellule cancerose discendono da una unica cellula madre mutata.



**Figura 8** Trasformazione neoplastica dovuta ad accumulo di mutazioni geniche

Questo casuale disordine genetico spiega l'estrema variabilità per aspetto, effetti, sintomi e prognosi delle molte forme di cancro note. Il tumore è dunque un processo multifasico, durante il quale alterazioni genetiche multiple si verificano, di solito, nel corso di vari anni. Nella maggior parte dei casi si tratta di mutazioni somatiche (traslocazioni cromosomiche, delezioni, inversioni, amplificazioni o mutazioni puntiformi), presenti solo nelle cellule tumorali.

Alcune di queste mutazioni sono responsabili dell'attivazione di *oncogeni*, i quali sono degli effettori della trasformazione neoplastica.<sup>13</sup> Al contrario, i prodotti dei geni *oncosoppressori* sono dei regolatori negativi della crescita ed è la loro perdita funzionale a promuovere il processo neoplastico, ad esempio la mutazione o cancellazione degli oncogeni soppressori *p53* e *p16*, l'incremento dei geni che proteggono la cellula dall'apoptosi (*bcl-2*) ed un aumento nell'espressione di cicline D (oncogene *prad*) che promuovono l'ingresso della cellula nel processo di sintesi del DNA. La proteina oncosoppressiva *p53* è quella più coinvolta; infatti, in risposta al danno del DNA essa provoca l'arresto del ciclo cellulare e permette di riparare il DNA o, se il danno è eccessivo, di condurre alla morte cellulare. È sempre più chiaro che il funzionamento della *p53*, come segnale di danno, viene perso nella maggior parte, se non da tutti, i tumori umani. Le mutazioni genetiche alla base del cancro possono essere acquisite per l'azione di agenti ambientali quali sostanze chimiche, radiazioni o virus, oppure possono essere ereditate nella linea germinale.<sup>14</sup>

Le alterazioni necessarie perché una data cellula dia origine alla patologia sono le seguenti, e sono comuni a tutti i tipi di cancro:

- a) indipendenza dai segnali di crescita,
- b) resistenza agli inibitori della crescita,
- c) resistenza alla “morte cellulare programmata” (apoptosi),
- d) replicazione illimitata,
- e) angiogenesi sostenuta,
- f) invasività tissutale e una capacità di formare metastasi.

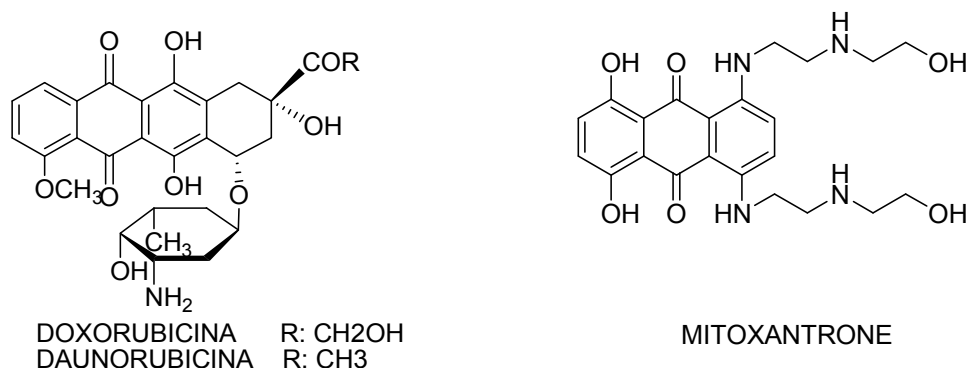
I tumori, nonostante il meccanismo generale di origine sia unico, possono manifestare una gamma molto vasta di evoluzioni e sintomatologie. Di solito la crescita di un tumore segue una legge geometrica: è molto lenta all'inizio, ma accelera all'aumentare della massa del

tumore. La dimensione critica di un tumore è di circa 1 centimetro cubico: raggiunta tale dimensione il tumore inizia a crescere molto velocemente e a dare luogo ai primi sintomi, e diventa rilevabile con visite mediche e analisi (marker tumorali presenti nel sangue); purtroppo però, spesso i sintomi iniziali vengono ignorati o sottovalutati.

I farmaci antitumorali correntemente utilizzati nei protocolli terapeutici agiscono su bersagli molecolari specifici, come ad esempio il DNA, la cui intercalazione blocca la sintesi di nuovo DNA o RNA (o di entrambi), causa la scissione dei filamenti di DNA e interferisce con la replicazione cellulare.

Purtroppo, a differenza di quanto verificatosi con gli antibiotici, non è stato possibile scoprire farmaci specifici per le cellule tumorali, poiché esse sono molto simili da un punto di vista metabolico a quelle normali. Ne consegue che l'azione selettiva dei farmaci antitumorali si basa più su differenze quantitative che qualitative tra cellule neoplastiche e normali. La più importante di queste differenze riguarda la cinetica della proliferazione cellulare.

Una delle classi di farmaci più efficace nel trattamento delle neoplasie è rappresentata dalle strutture di tipo chinonico<sup>15</sup> presente nelle antracicline, *Daunorubicina* e *Doxorubicina* e nel *Mitoxantrone*



**Figura 9** Farmaci chemioterapici con struttura chinonica

I principali meccanismi, alla base della loro tossicità nei confronti delle cellule neoplastiche o delle strutture dell'organismo, sono tre<sup>16</sup>:

1. *Legame ad alta affinità per il DNA*, dovuto ad intercalazione e che determina un blocco della sintesi degli acidi nucleici oltre che una scissione dei filamenti del DNA, mediata da modificazioni della Topoisomerasi II;

L'intercalazione è un processo di legame al DNA che ha luogo facendo intervenire solo forze di tipo fisico. Durante l'intercalazione, il sistema planare della molecola si inserisce in maniera parallela tra le coppie di basi adiacenti mentre il sostituito di natura glicosidica per la doxorubicina e di tipo idrossi-alchil-aminico nel caso del mitoxantrone stabilizza il complesso. Ciò provoca variazioni nelle proprietà idrodinamiche, distorsioni dell'elica dell'acido nucleico e modificazioni nella topologia delle basi nucleari. Numerose funzioni del DNA vengono così compromesse, compresa la sintesi di DNA e RNA. Le antracicline sono anche in grado di causare rotture di uno o entrambi i filamenti; si ritiene che questo effetto sia mediato dal legame del farmaco al DNA e alla Topoisomerasi II, azione che previene la risaldatura dei tagli nel DNA creati dall'enzima.

2. *Produzione di un radicale libero semichinonico e di radicali dell'ossigeno, attraverso un processo enzimatico di ossido-riduzione.*

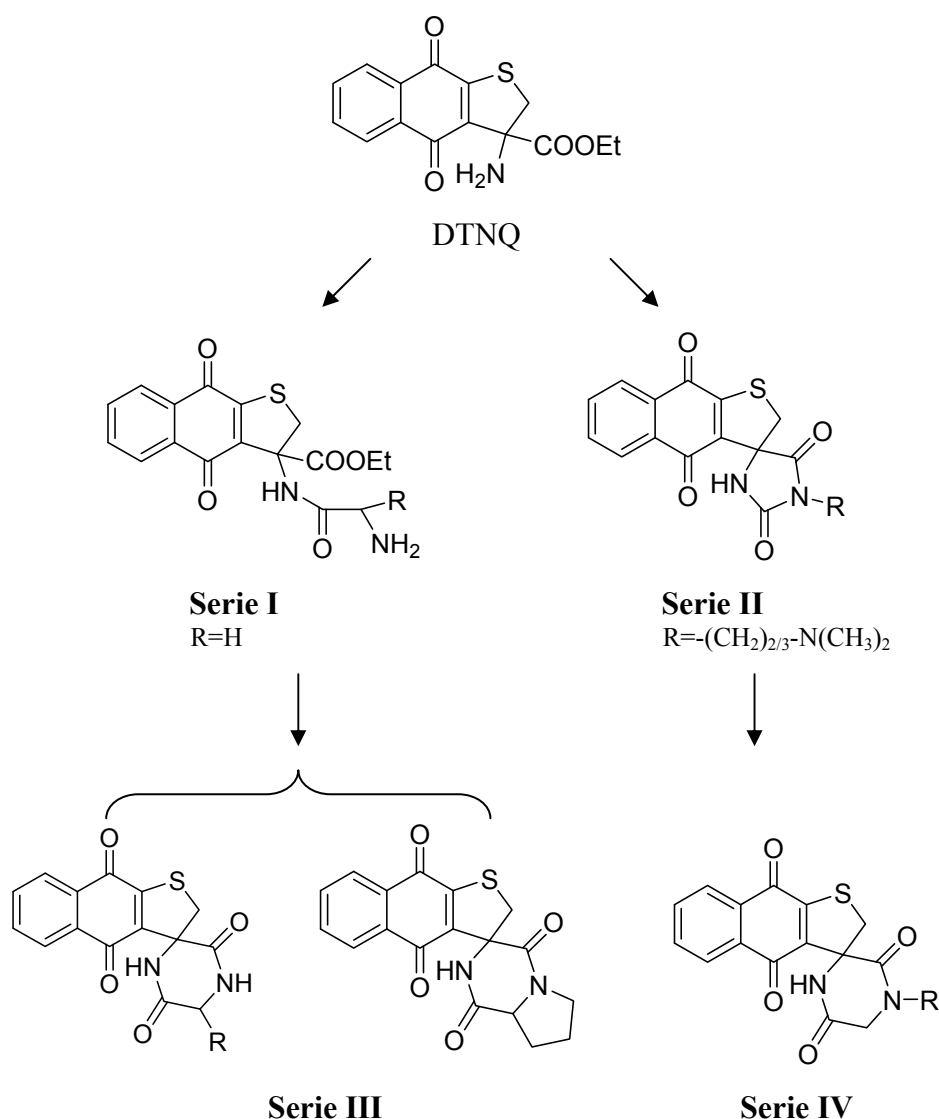
Le antracicline reagiscono con la citocromo P450 reduttasi in presenza di nicotinammide adenina dinucleoside fosfato ridotto (NADPH), generando radicali intermedi semichinonici che, a loro volta, possono reagire con l'ossigeno e produrre radicali anionici superossidi. Questi possono generare sia perossido di idrogeno sia radicali ossidrilici che attaccano il DNA e ne ossidano le basi. Quest'ultimo meccanismo potrebbe essere responsabile della cardiotossicità, a seguito di un danno di membrana causato da radicali dell'ossigeno soprattutto in presenza di ioni ferrosi. Possedendo, infatti, gruppi chinonici e fenolici, le antracicline sono in grado di formare complessi chelanti con cationi bivalenti (calcio, ferro).

3. *Legame alle membrane, che ne altera la fluidità e il trasporto degli ioni.*

Un serio problema causato dall'utilizzo delle antracicline è rappresentato dalla resistenza multi-farmaco. Questo sembra essere il risultato dell'accelerazione dell'efflusso di antracicline e di altri composti dalle cellule. In questo processo sembra essere coinvolta la glicoproteina P, sintetizzata in grande quantità come risultato di un meccanismo di amplificazione genica.<sup>17,18</sup>

Considerata l'importanza di strutture contenenti un nucleo chinonico, ricerche esaurienti sono state dedicate allo sviluppo di nuovi agenti antineoplastici correlati alle antracicline, allo scopo di superare seri problemi che limitano l'utilizzo di questi composti, quali la manifestazione di farmaco-resistenza e la tossicità sulle cellule del miocardio.<sup>19,20</sup> In questo senso, il gruppo di ricerca presso il quale ho svolto l'attività di dottorato, ha progettato e sintetizzato nuovi derivati che conservassero una struttura chinonica di base.

La progettazione di queste nuove molecole, basata sulla diminuzione della dimensione anellare del cromoforo e l'introduzione di eteroatomi nella struttura chinonica di base, ci ha portato alla individuazione del sistema 3-amino-3-etossicarbonil-2,3-diidrotieno[2,3-*b*] nafto-4,9-dione, denominato **DTNQ**,<sup>21</sup> che risulta dotato di attività citotossica a concentrazioni micromolari, inoltre la presenza di un gruppo funzionale amino-estereo, facilmente modificabile, lo rende un ottimo *template* per lo sviluppo di derivati con potenziale attività citotossica.



**Figura 10** Strutture del template DTNQ e dei suoi derivati

Sono state progettate e sintetizzate diverse serie di composti (Figura 10) contenenti il sistema DTNQ. Le prime modifiche apportate comprendono sia l'incorporazione di amminoacidi e dipeptidi attraverso il gruppo amminico della posizione 3 (**serie I**),<sup>22</sup> sia di diverse catene alchiliche, idrossi-alchiliche ed ammino-alchiliche sostituite, attraverso un anello idantoinico (**serie II**).<sup>23</sup> Il composto 3-(glycylamino)-3-(ethoxycarbonyl)-2,3-dihydrothieno[2,3-*b*]naphtho-4,9-dione ( $R = H$ ) della prima serie, mantiene un'attività citotossica a concentrazione submicromolare nei confronti di diverse linee cellulari di leucemie e tumori solidi.



Nella seconda serie i derivati più potenti il 3-[2-(*N,N*-dimethylamino)ethyl e propyl]-spiro[(dihydroimidazo-2,4-dione)-5,3'-(2',3'-dihydrothieno[2,3-*b*]naphtho-4',9'-dione)] mostravano attività non solo verso diverse linee cellulari di tumori solidi, comparabile a quella della doxorubicina, ma anche verso alcune linee cellulari doxorubicina e cis-platino-resistenti. L'aumento di attività osservato con questa seconda serie sembra indicare che la restrizione conformazionale indotta dall'anello idantoinico permette un orientamento ottimale delle catene laterali rispetto alla struttura planare.

In base a questi risultati, sono state progettate e sintetizzate due nuove serie di derivati in cui venivano modificate sia le dimensioni dello spiro nucleo legato al DTNQ sia la natura delle catene funzionali a loro coniugata

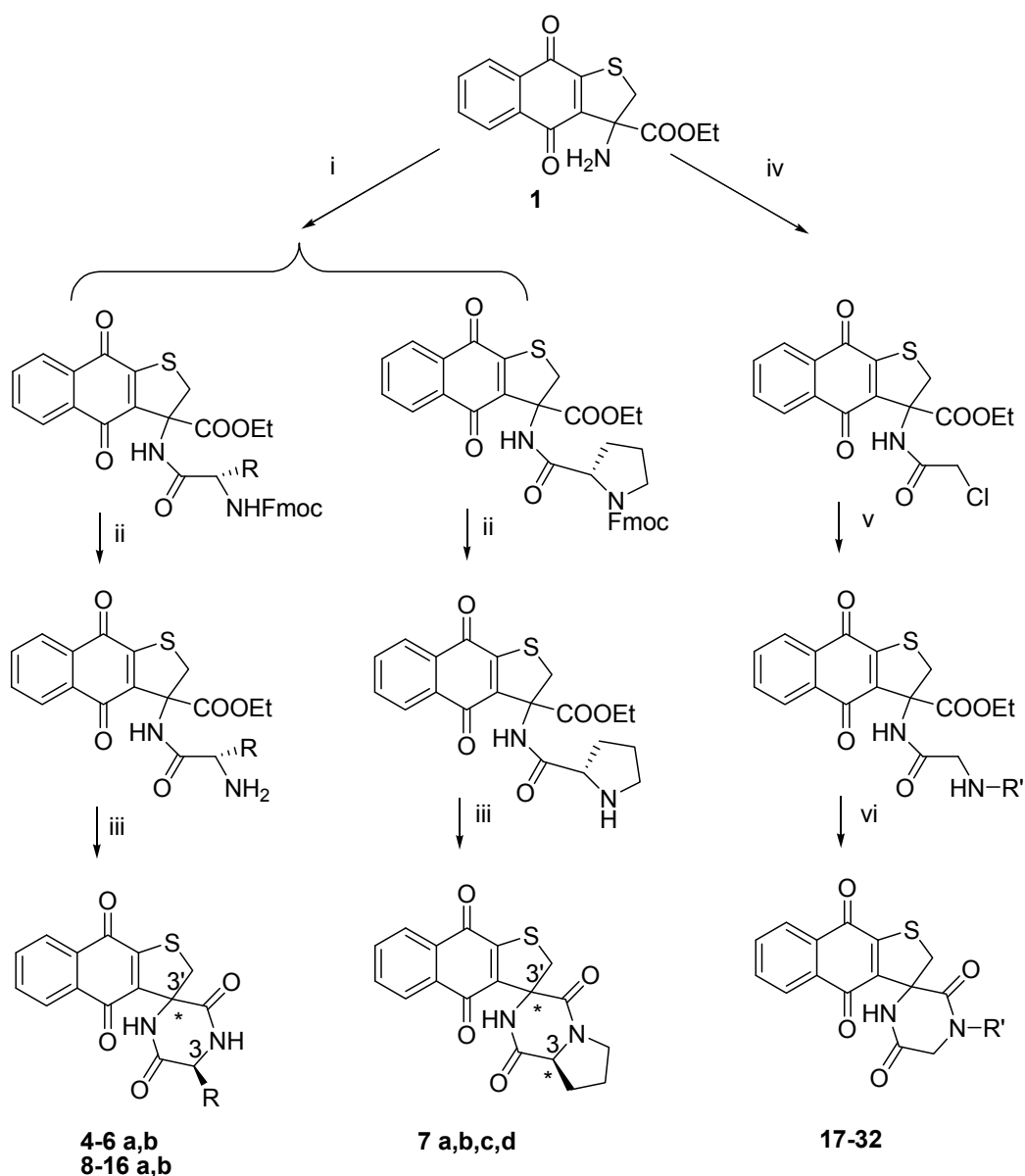
A questo scopo, la lattamizzazione intramolecolare dei derivati appartenenti alla serie I conduce alla formazione di un anello dichetopiperazinico sostituito con catene laterali derivanti da aminoacidi nella posizione C-3.<sup>24</sup> Parallelamente, l'introduzione nella posizione N-4 di un anello dichetopiperazinioco di catene alchiliche, idrossi-alchiliche, mercapto-alchiliche ed alchilaminiche, simili a quelle presenti nella serie spiroidantoinica, dà luogo ai derivati della serie IV.<sup>25</sup>

La necessità di dover sintetizzare in modo veloce nuove molecole per effettuare un rapido screening della loro attività citotossica, al fine di completare un'efficiente relazione struttura-attività, ci ha spinto verso l'utilizzo delle microonde come strumento di *lead optimization*.

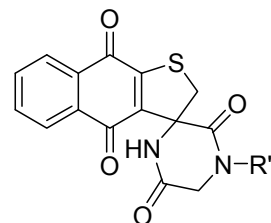
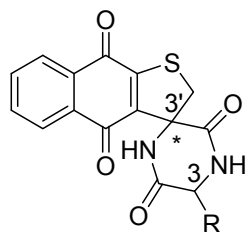
## 2.2 RISULTATI E DISCUSSIONI

### 2.2.1 CHIMICA

La sintesi dei derivati spirodichetopiperazinici C-3 e N-4 sostituiti è stata effettuata secondo lo schema 1 descritto.



**Schema 1** Reagenti e condizioni i) Fmoc-Aaa-OH, HBTU, HOBt, DIPEA, DMF, rt, 24 h; ii) 20% piperidine/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 30 min, iii) MeOH, TEA, reflux, 1-3 h; iv) cloroacetil cloruro, DIPEA, THF, rt, 10 min; v) NH<sub>2</sub>-R, TEA, THF; vi) MeOH, TEA, reflux, 1-3 h



compd	stereochemistry 3,3'	R
4a,b	3'SR	-H
4a	3'R	-H
4b	3'S	-H
5a	3S,3'R	-CH <sub>3</sub>
5b	3S,3'S	-CH <sub>3</sub>
6a	3S,3'R	-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
6b	3S,3'S	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
7a	3S,3'R	-cyclo(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )-
7b	3S,3'S	-cyclo(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )-
7c	3R,3'S	-cyclo(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )-
7d	3R,3'R	-cyclo(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )-
8a	3S,3'R	-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
8b	3S,3'S	-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
9a	3S,3'R	-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (4-OH)
9b	3S,3'S	-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (4-OH)
10a	3S,3'R	-CH <sub>2</sub> OH
10b	3S,3'S	-CH <sub>2</sub> OH
11a	3R,3'R	-CH <sub>2</sub> SH
11b	3R,3'S	-CH <sub>2</sub> SH
12a	3S,3'R	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub>
12b	3S,3'S	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub>
13a	3S,3'R	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>
13b	3S,3'S	-(CH <sub>2</sub> )NH <sub>2</sub>
14a	3S,3'R	-CH <sub>2</sub> -imidazole
14b	3S,3'S	-CH <sub>2</sub> -imidazole
15a	3S,3'R	-CH <sub>2</sub> COOH
15b	3S,3'S	-CH <sub>2</sub> COOH
16a	3S,3'R	-CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
16b	3S,3'S	-CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>

compd	R'
4a, b	-H
(+)-3'S- 4b	-H
(-)-3'R- 4a	-H
17	-CH <sub>3</sub>
18	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
19	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH
20	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OH
21	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SH
22	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SH
23	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>
24	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NH <sub>2</sub>
25a,b	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
(+)-3'-S- 25a	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
(-)-3'-R- 25b	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
26	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
27	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
28a,b	ethylpyrrolidine
(+)-3'S- 28a	ethylpyrrolidine
(-)-3'R- 28b	ethylpyrrolidine
29	ethylpiperidine
30	ethylmorpholine
31	ethylimidazole
32	propylimidazole

**Tabella 1**

La condensazione del sistema DTNQ con i corrispondenti aminoacidi N<sup>α</sup>-Fmoc, utilizzando agenti di coupling come HOBt e HBTU, ha portato all'ottenimento di pseudodipeptidi come miscela di diastereoisomeri. Per la sintesi dei composti contenenti

catene laterali funzionalizzate (-CH<sub>2</sub>OH, -CH<sub>2</sub>SH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>-imidazolo, -CH<sub>2</sub>COOH o -CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>), sono stati utilizzati i corrispondenti aminoacidi N<sup>α</sup>-Fmoc protetti, Ser, Cys, Lys, Hys, Asp, e Asn, con gruppi sensibili all'ambiente acido (Trt, Boc) in catena laterale. Successivamente, la rimozione del gruppo Fmoc, utilizzando una soluzione di piperidina in DCM al 20% ed il trattamento con TEA in MeOH a refluxo hanno portato a lattamizzazione intramolecolare con formazione dei corrispondenti derivati 3-sostituiti spiro[(dihydropyrazine-2,5-dione)-6,3'-(2',3'-dihydrothieno[2,3-*b*]naphtho-4',9'-dione)] con rese complessive del 46-60%.

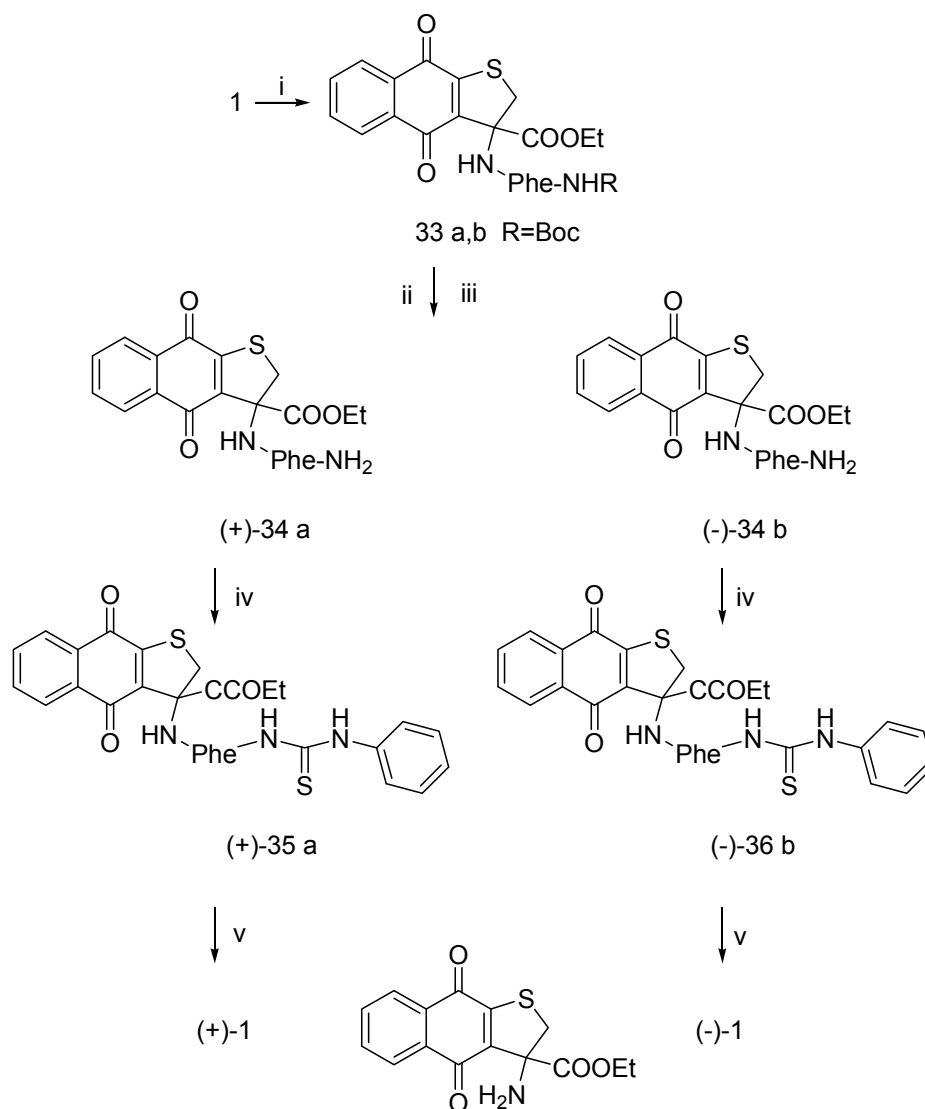
Infine la rimozione dei gruppi protettori in catena laterale con TFA al 20% in DCM ha permesso l'ottenimento dei corrispondenti derivati spirodichetopiperazinici con rese totali del 36-53%.

Riguardo ai derivati della serie IV, la condensazione del DTNQ con il cloroacetil cloruro in THF, usando diisopropilammina come base, ha portato al derivato 3-(2'-chloro)acetamide-3-ethoxycarbonyl-2,3-dihydrothieno[2,3-*b*]naphtho-4,9-dione con il 90% di resa. Successivamente, la sostituzione nucleofila del cloro del composto 2 con una vasta serie di ammine in THF e diisopropilammina come base a refluxo, ha portato all'ottenimento dei corrispondenti analoghi (2'-aminoalkyl *o*-aminoalkylsubstituted)acetamide

In queste condizioni, l'HPLC e l'<sup>1</sup>H NMR hanno mostrato una parziale ciclizzazione, più o meno estesa, del composto lineare. La completa lattamizzazione di questi derivati in MeOH a refluxo con TEA come base fornisce i derivati spirodichetopiperazinici sostituiti sull'N-4 con il 40-55% di resa totale. Successivamente, i composti, che presentavano una funzione aminica terziaria terminale, sono stati trattati con una soluzione di acido cloridrico in dietil etere per ottenere il corrispondente sale al fine di migliorarne la solubilità per i saggi biologici. Mentre i derivati tioetil (**21**), tiopropil (**22**), aminoetil (**23**) ed aminopropil (**24**) sono stati sottoposti a reazione di deprotezione dei gruppi protettori S-Trt e NH-Boc utilizzando una soluzione al 20% di TFA in DCM, in rese quantitative.

Dal momento che la sintesi della DTNQ genera un carbonio asimmetrico C-3, il composto finale **4a,b** della prima serie ed i composti finali della seconda serie sono stati ottenuti e saggiati come miscela racemica, mentre gli altri composti della prima serie si ottengono come miscela di diastereoisomeri risolvibili mediante cromatografia e quindi sono stati saggiati come tali per l'attività citotossica.

Per verificare e valutare l'influenza della stereochimica di questo centro chirale sull'attività dei composti racemici più attivi, i composti enantiomericamente puri **4**, **25** e **28** sono stati sintetizzati a partire dagli enantiomeri puri della DTNQ, risolti precedentemente mediante metodica di Evans,<sup>26</sup> secondo lo schema 2.

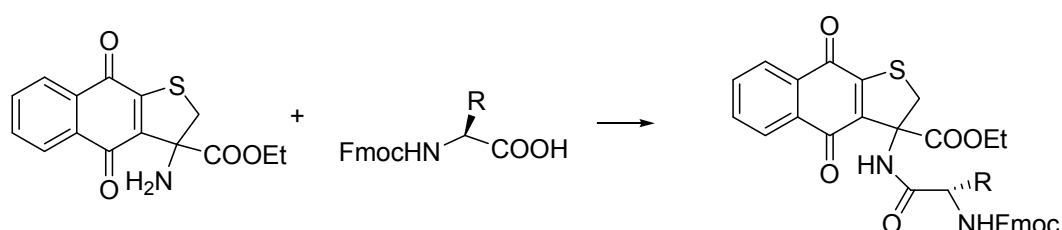


**Schema 2** Reagenti e condizioni: i) Boc-Phe-OH, HBTU, HOBt, DIEA, DMF, rt, 48 h; ii) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 2h, successivamente TEA; iii) separazione cromatografia; iv) fenilisotiocianato, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, refluxo, 1h; v) TFA in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt. 1h.

Gli step di sintesi della prima serie che hanno presentato maggiori difficoltà sono state il primo accoppiamento con gli aminoacidi e la lattamizzazione intramolecolare.

Per questo motivo abbiamo pensato di poterli ottimizzare mediante le microonde

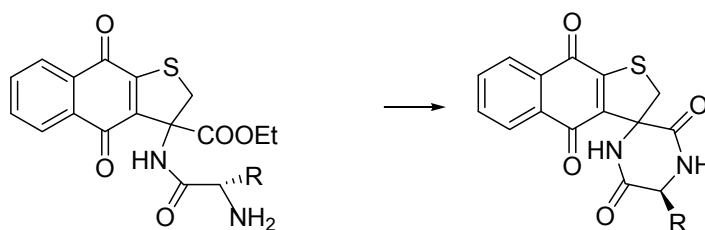
Come si può vedere in tabella 2, le reazioni di coupling condotte con l'ausilio delle microonde ad una potenza di 100 Watt e per un tempo di 20 minuti ha portato ad un netto miglioramento delle rese soprattutto con aminoacidi ingombrati come Prolina e Leucina. (Tabella 2)



Aaa	Standard		Microwave	
	Tempo (ore)	Resa (%)	Tempo (min)	Resa (%)
Gly	20	80	20	85
Ala	23	80	20	85
Pro	30	50	20	70
Leu	28	55	20	75
Phe	25	80	20	90
Lys	25	75	20	80
Cys	24	75	20	80

**Tabella 2**

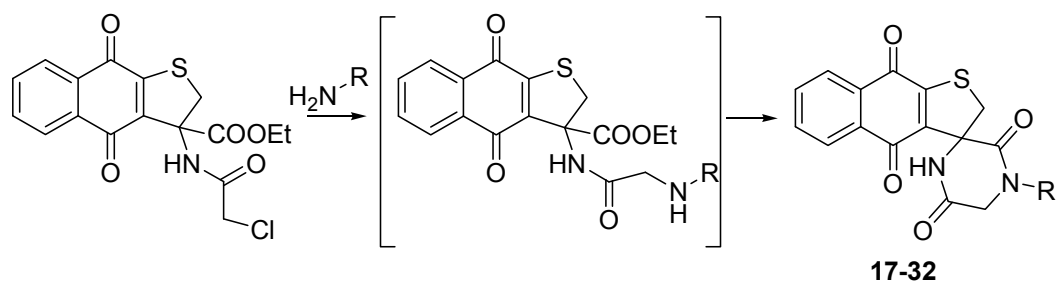
La ciclizzazione intramolecolare condotta in metanolo sotto irradiazione di microonde ha portato un miglioramento delle rese di reazione, con risultati simili alla reazione precedenti, infatti anche in questo caso il miglioramento maggiore si è avuto con i due residui più ingombranti Prolina e Leucina. (Tabella 3)



Aaa	Standard		Microwave	
	Tempo (ore)	Resa (%)	Tempo (min)	Resa (%)
Gly	4	90	10	92
Ala	5	80	10	85
Pro	8	50	10	73
Leu	6	55	10	75
Phe	4	80	10	89
Lys	5	70	10	75
Cys	5	75	10	80

**Tabella 4**

Anche per la seconda serie ho studiato l'influenza delle microonde nei vari step di reazione. Lo step più lungo risulta la sostituzione nucleofila del cloro con le diverse amine, anche se le rese di questa reazione sono quantitative, infatti come possiamo vedere in tabella le rese sono identiche sia in condizioni standard che sotto l'ausilio delle microonde ma i tempi di reazione sono notevolmente ridotti, passando dalle 5-8 ore ai 10 minuti, inoltre in queste condizioni la lattamizzazione intramolecolare è pressoché completa (>90%).



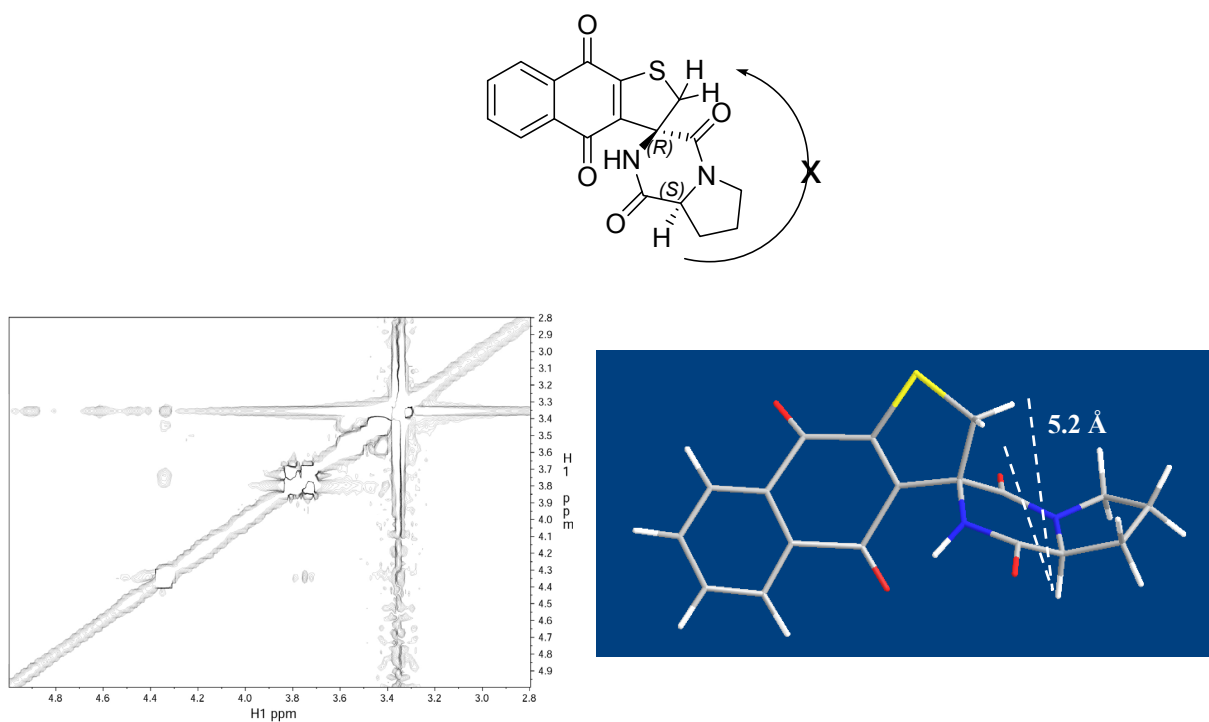
Composto		Standard			Microwave		
		Tempo (ore)	Sostituzione nucleofila	Lattamizzazione %	Tempo (min)	Sostituzione nucleofila	Lattamizzazione %
17	-CH <sub>3</sub>	4	100	15	10	100	99
18	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	5	100	12	10	100	94
19	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	8	100	6	10	100	92
20	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OH	6	100	9	10	100	98
21	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SH	4	100	8	10	100	93
22	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SH	5	100	13	10	100	99
23	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	5	100	10	10	100	94
24	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NH <sub>2</sub>	4	100	15	10	100	99
25	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	5	100	12	10	100	94
26	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	8	100	6	10	100	92
27	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	6	100	9	10	100	98
28	ethylpyrrolidine	4	100	8	10	100	93
29	ethylpiperidine	5	100	13	10	100	99
30	ethylmorpholine	5	100	10	10	100	94
31	ethylimidazole	6	100	12	10	100	95
32	propylimidazole	4	100	8	10	100	93

**Tabella 5**

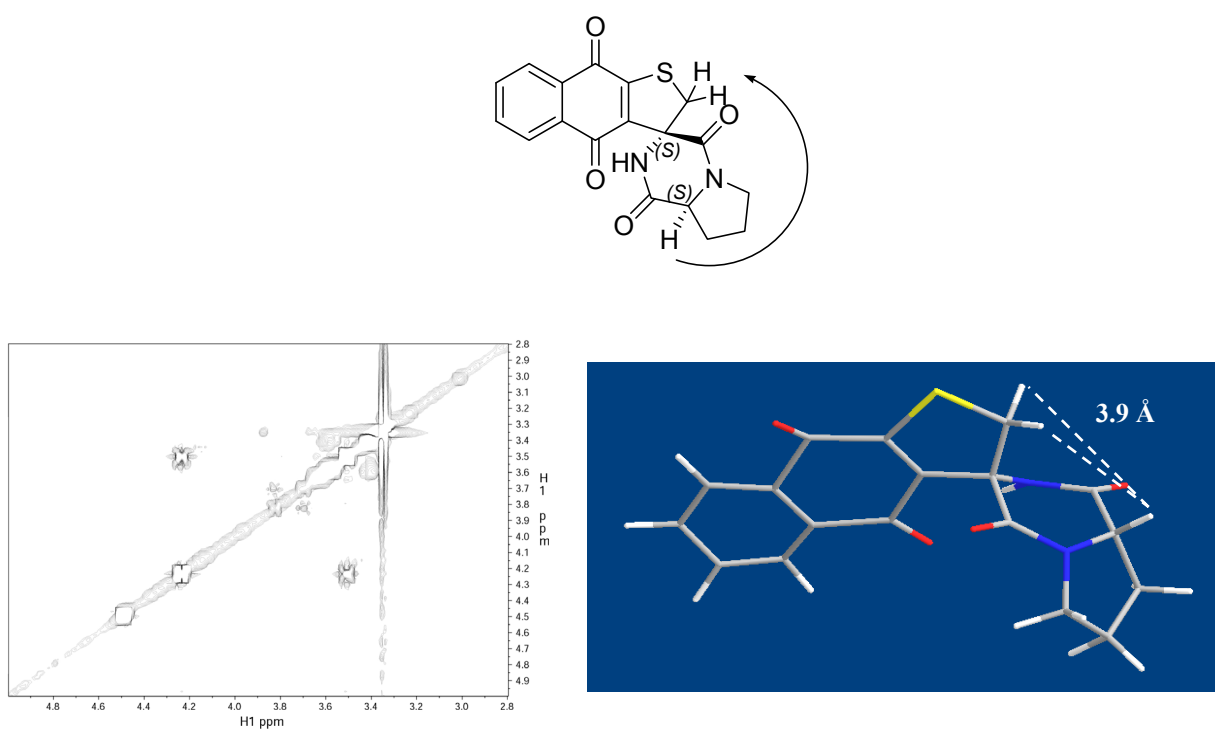
La determinazione della configurazione assoluta del centro asimmetrico C-3' è stata effettuata mediante studi NMR dei composti **7a**, **7b**, **8a**, **8b**, **9a**, **9b**, **14a**, e **14b**, che mostravano una maggiore differenza per NMR. La sola differenza osservata negli spettri 2D NOESY<sup>27</sup> dei derivati di “tipo a” comparata a quelli di “tipo b” era la presenza negli ultimi di fenomeni NOE di sia di H-2'<sup>a</sup> (segnale di H-2' a campi bassi) e H-2'<sup>b</sup> (segnale di H-2' a campi alti) con H-3 (che corrisponde all'H-α della prolina). Analisi di simulazione dinamica molecolare mostravano che le distanze di entrambi gli idrogeni H-2'(s) e H-3 erano di circa 3.9 Å nell'isomero 3S, 3'S e di circa 5.2 Å nell'isomero 3S, 3'R. Per cui la



stereochimica 3S, 3'R poteva essere assegnata ai composti della serie **a** e 3S, 3'S ai composti della serie **b**. Questa assegnazione è in accordo con lo shift verso campi bassi osservato per il segnale dell'H-2'<sup>a</sup> nei composti **a** comparati con gli stessi segnali nei composti **b**, che rappresenta la differenza più significativa di risonanza negli spettri <sup>1</sup>H NMR delle due serie. Modelli molecolari mostrano che la distanza tra H-2'<sup>a</sup> e l'ossigeno carbonilico O-5 è minore nei composti **a** in confronto a quelli **b** (2.5-2.7 Å vs 2.8-3.0 Å). Si può ipotizzare che il deschermamento risultante del H-2'<sup>a</sup> spiega lo shift di risonanza osservato.



**Figura 11.** spettro NOESY (regione zoom 5.0-2.8 ppm) del composto **7a**. e minimizzazione energetica



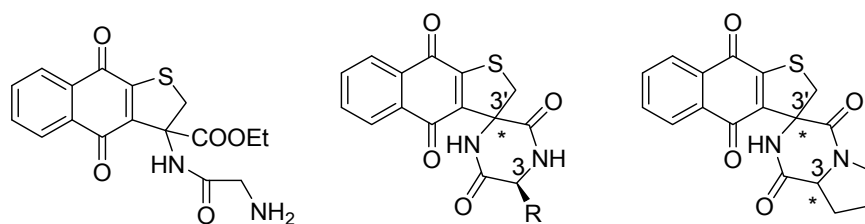
**Figura 12.** spettro NOESY (regione zoom 5.0-2.7 ppm) del composto **7b** e minimizzazione energetica

## **2.3 CITOTOSSICITA' *IN VITRO***

### **2.3.1 SERIE III**

I composti della serie III sono stati valutati, *in vitro*, come potenziali agenti citotossici su colture di linee cellulari MCF-7 e SW620, derivate da carcinomi umani di seno e di colon rispettivamente presso l'Istituto dei Tumori Fondazione "G. Pascale" di Napoli.

Come mostrato nella tabella, in cui sono state inserite la doxorubicina e l'analogo lineare pseudodipeptidico **2a** per confronto, il composto **4** sia nella forma racemica che enantiomericamente pura mostrava una potente attività citotossica sulle linee cellulari MCF-7 e SW-620, essendo circa 4 volte più potente del derivato **2a** e solo 2 volte meno attivo della doxorubicina.



Compound	Stereochemistry 3, 3'	R	IC <sub>50</sub> (μM±SD) <sup>a</sup>	
			MCF-7 <sup>b</sup>	SW620 <sup>c</sup>
<b>2a</b>	3 <i>SR</i>	H	0.196±0.005	1.100±0.001
<b>4ab</b>	3' <i>SR</i>	H	0.047±0.001	0.245±0.036
<b>4a</b>	3' <i>R</i>	H	0.046±0.001	0.267±0.008
<b>4b</b>	3' <i>S</i>	H	0.049±0.001	0.326±0.010
<b>5a</b>	3 <i>S</i> , 3' <i>R</i>	CH <sub>3</sub>	0.053±0.013	0.287±0.014
<b>5b</b>	3 <i>S</i> , 3' <i>S</i>	CH <sub>3</sub>	0.098±0.010	0.776±0.014
<b>6a</b>	3 <i>S</i> , 3' <i>R</i>	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.090±0.013	0.414±0.030
<b>6b</b>	3 <i>S</i> , 3' <i>S</i>	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.160±0.007	0.476±0.011
<b>7a</b>	3 <i>S</i> , 3' <i>R</i>	Cyclo(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )-	0.020±0.004	0.120±0.030
<b>7b</b>	3 <i>S</i> , 3' <i>S</i>	Cyclo(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )-	0.263±0.047	0.840±0.030
<b>7c</b>	3 <i>R</i> , 3' <i>S</i>	Cyclo(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )-	0.017±0.008	0.010±0.020
<b>7d</b>	3 <i>R</i> , 3' <i>R</i>	Cyclo(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )-	0.213±0.060	1.200±0.300
<b>8a</b>	3 <i>S</i> , 3' <i>R</i>	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	0.060±0.010	0.445±0.170
<b>8b</b>	3 <i>S</i> , 3' <i>S</i>	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	0.140±0.040	0.459±0.180
<b>9a</b>	3 <i>S</i> , 3' <i>R</i>	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (4-OH)	0.085±0.009	0.700±0.050
<b>9b</b>	3 <i>S</i> , 3' <i>S</i>	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (4-OH)	0.154±0.010	1.000±0.300
<b>10a</b>	3 <i>S</i> , 3' <i>R</i>	CH <sub>2</sub> OH	0.243±0.030	0.894±0.040
<b>10b</b>	3 <i>S</i> , 3' <i>S</i>	CH <sub>2</sub> OH	0.456±0.050	1.530±0.250
<b>11a</b>	3 <i>R</i> , 3' <i>R</i>	CH <sub>2</sub> SH	0.029±0.009	0.210±0.008
<b>11b</b>	3 <i>R</i> , 3' <i>S</i>	CH <sub>2</sub> SH	0.069±0.009	0.224±0.050
<b>12a</b>	3 <i>S</i> , 3' <i>R</i>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub>	0.036±0.009	0.229±0.031
<b>12b</b>	3 <i>S</i> , 3' <i>S</i>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub>	0.108±0.019	0.765±0.100
<b>13a</b> <sup>d</sup>	3 <i>S</i> , 3' <i>R</i>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>	0.083±0.011	0.825±0.079
<b>13b</b> <sup>d</sup>	3 <i>S</i> , 3' <i>S</i>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>	0.179±0.007	1.715±0.160
<b>14a</b>	3 <i>S</i> , 3' <i>R</i>	CH <sub>2</sub> Imidazole	0.660±0.111	1.929±0.163
<b>14b</b>	3 <i>S</i> , 3' <i>S</i>	CH <sub>2</sub> Imidazole	1.850±0.102	>4000
<b>15a</b>	3 <i>S</i> , 3' <i>R</i>	CH <sub>2</sub> COOH	1.700±0.110	0.285±0.059
<b>15b</b>	3 <i>S</i> , 3' <i>S</i>	CH <sub>2</sub> COOH	1.930±0.050	>4000
<b>16a</b>	3 <i>S</i> , 3' <i>R</i>	CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	0.351±0.030	1.528±0.032
<b>16b</b>	3 <i>S</i> , 3' <i>S</i>	CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	0.835±0.013	3.353±0.079
<b>Doxorubicin</b>			0.022±0.008	0.178±0.003

<sup>a</sup> Data represent mean values (±SD) for three independent determinations. <sup>b</sup> Human breast carcinoma cell line. <sup>c</sup> Human colon carcinoma cell line. <sup>d</sup> Evaluated as TFA salts.

**Tabella 6**

I risultati in tabella rivelano alcune importanti relazioni struttura-attività. Per primo, l'attività citotossica è notevolmente influenzata dalla natura della catena lineare sul carbonio C-3 dell'anello dichetopiperazinico. Secondo, la configurazione relativa dei carboni 3 e 3' hanno un'importante influenza sull'attività citotossica di questi composti, determinando un orientamento preferenziale delle catene laterali. Infatti i diastereoisomeri 3S,3'R e 3R,3'S sono in generale 2-3 volte più potenti dei corrispondenti diastereoisomeri 3S,3'S e 3R,3'R. L'incorporazione di un piccolo sostituito alchilico (-CH<sub>3</sub>, **5a**) in posizione 3 è ben tollerata, ma una maggior caduta di attività si osserva con sostituenti più ingombrati stericamente (**6**). Un'ulteriore restrizione conformazionale introdotta con gli aminoacidi L- e D-Pro ha fornito i derivati più potenti della serie. Infatti **7a** ed il suo enantiomero **7c** (IC<sub>50</sub> = 20 e 17 nM rispettivamente) sono 10 volte più potenti dei corrispondenti diastereoisomeri **7b** e **7d** e mostrano un'attività simile a quella della doxorubicina sulla linea cellulare MCF-7. In aggiunta il composto **7c** è 17 volte più attivo della doxorubicina sulla linea SW-620 (IC<sub>50</sub> = 10 vs 178 nM).

La presenza di un gruppo benzilico (**8a,b**), ed idrossi-benzilico (**9a,b**) porta ad una significativa perdita di attività. L'incorporazione di aminoacidi contenenti zolfo ha fornito i potenti derivati **11a** e **12a** che mantengono una citotossicità simile a quella dei composti **7a**, **7c** e della doxorubicina. I composti contenenti gruppi ossidrilici, amminici e imidazolici ed amidici sono meno potenti del **7a**. Infine la presenza di una funzione acida (**15**) porta ad una drammatica riduzione dell'attività.

I composti più attivi (**7**, **11**, **12**) sono stati testati su un pannello di linee cellulari umane diverse, al fine di determinarne l'attività antitumorale ed il profilo di farmaco-resistenza (tabella 7).

Compound	IC <sub>50</sub> (μM±SD) <sup>a</sup>					
	A2780 Ovarian	NCI-H460 Lung	HCT-116 Ileocecal	PC-3 Prostate	LoVo Colon	MeVo Melanoma
<b>7a</b>	0.105±0.001	0.114±0.01	0.090±0.010	0.153±0.01	0.420±0.03	0.075±0.01
<b>7b</b>	0.530±0.03	0.994±0.10	0.838±0.030	0.610±0.09	1.410±0.10	0.570±0.004
<b>7c</b>	0.036±0.002	0.052±0.01	0.240±0.002	0.110±0.01	0.320±0.06	0.150±0.01
<b>7d</b>	0.190±0.02	0.170±0.01	3.300±0.100	1.900±0.30	1.700±0.02	7.200±1.60
<b>11a</b>	0.190±0.02	0.470±0.04	0.350±0.030	0.307±0.05	0.870±0.10	0.075±0.02
<b>11b</b>	0.460±0.15	0.730±0.06	0.660±0.020	0.367±0.058	1.300±0.10	0.567±0.10
<b>12a</b>	0.180±0.03	0.256±0.03	0.256±0.010	0.293±0.017	0.540±0.07	0.057±0.01
<b>12b</b>	0.624±0.05	0.917±0.03	0.766±0.050	0.582±0.05	0.620±0.05	1.130±0.05
<b>doxo</b>	0.007±0.001	0.010±0.008	-	-	0.033±0.004	0.820±0.10

<sup>a</sup>Data represent mean values (±SD) for three independent determinations

**Tabella 7**

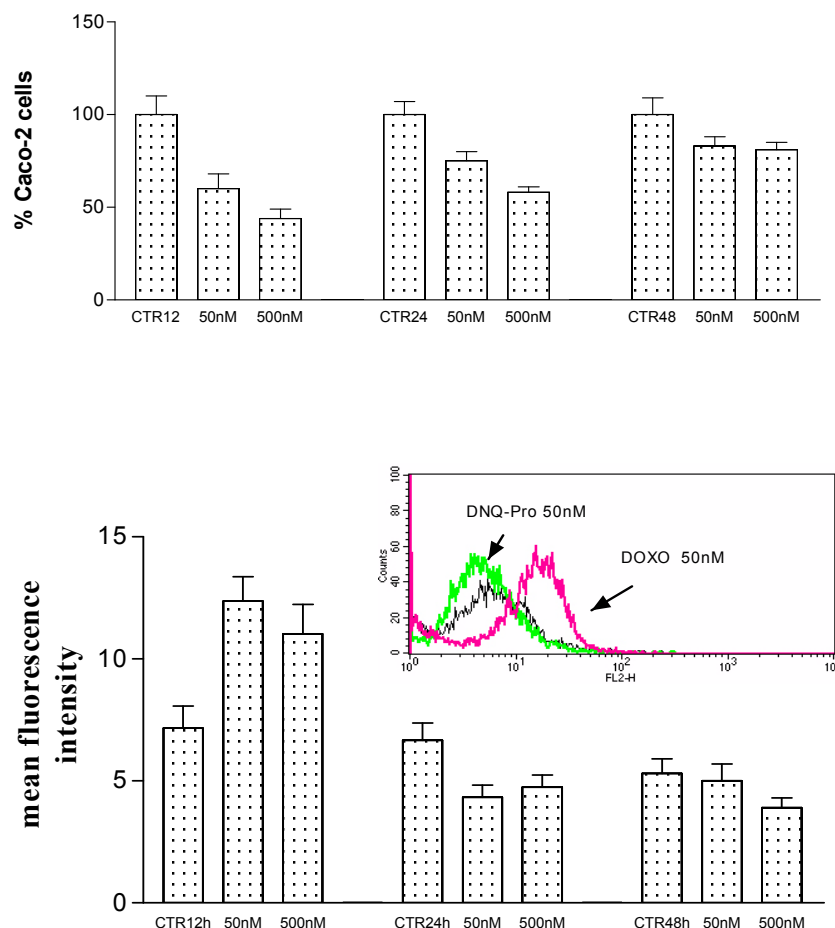
Nei sistemi cellulari testati A2780 (ovaio), NCI-H460 (polomone), HCT-116 (ileoecale), e PC3 (prostata), i composti **7a** e **7c** mostrano una marcata attività citotossica, e risultano molto attive anche nei confronti delle cellule tumorali LoVo del colon (IC<sub>50</sub>=420 e 320 nM rispettivamente). Inoltre, i composti **7a**, **11a**, e **12a** sono 11-, 11-, e 14- volte più potenti della doxorubicina in cellule tumorali MeVo di melanoma (IC<sub>50</sub>=75, 75, e 57 nM).

Allo scopo di valutarne il meccanismo d'azione, il composto **7a** (DTNQ-Pro) è stato testato su linee cellulari di adenocarcinoma del colon CaCo-2,<sup>28</sup> dove sono state valutate le variazioni dei livelli di heat-shock proteins (hsp), l'influenza sul ciclo cellulare, e l'attivazione di p53. Queste cellule risultano resistenti ai farmaci chemioterapici classici come la doxorubicina, probabilmente sia a causa di mutazioni nel gene p53, e quindi dell'inefficienza dell'apoptosi innescata da questo oncosoppressore, che di un elevato livello di heat-shock proteins (hsp), anche in assenza di condizioni di stress cellulare.

Questi studi, ancora da pubblicare, hanno dimostrato che la DTNQ-Pro ha una triplice azione citotossica tempo-dipendente sulle linee Caco-2 in vitro, con un meccanismo differente da quello della doxorubicina.

La somministrazione alle cellule Caco-2 di DTNQ-Pro induce una tossicità particolarmente evidente a 12h con il 57% di morte cellulare, mentre diminuisce a 24 e 48h di trattamento (33 e 17% di morte cellulare rispettivamente). La tossicità, osservata a 12 ore e che conduce a morte per necrosi, può essere esplicata con un aumento della formazione di

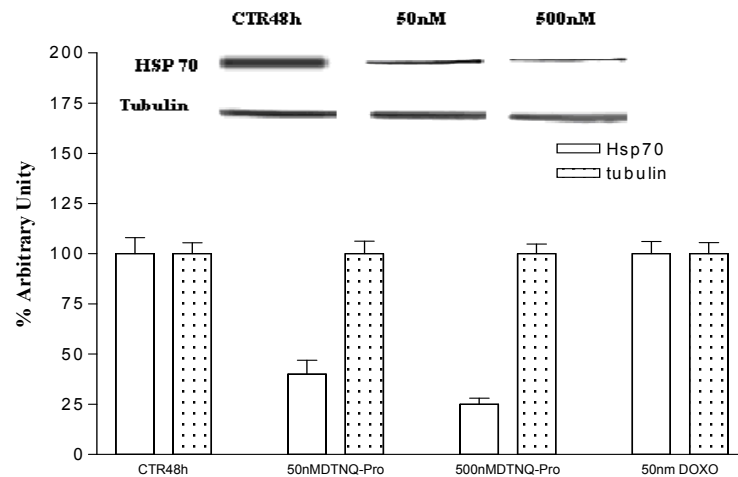
specie reattive all'ossigeno (ROS), causati anche da altri agenti antitumorali a struttura chinonica. E' noto che gli aspetti patologici dei ROS, sono correlati alla loro abilità di causare danno ossidativo al DNA nucleare e mitocondriale



**Figure 13. A)** Saggio di proliferazione delle cellule Caco-2, incubate con differenti concentrazioni di DTNQ-Pro, 12, 24 e 48h. **B)** Analisi Flow cytometric dello stress ossidativo nelle cellule Caco-2 indotto da DNQ-Pro e Doxorubicin, mediante misurazione della produzione dell'anione superossido, dopo 12, 24 e 48 h di trattamento con DTNQ-Pro (50nM and 500nM) a 37°C Nell'inserto è riportato lo spettro delle bande associate con stress ossidativo in cellule Caco-2 trattate per 48h con DNQ-Pro e Doxorubicin alla stessa concentrazione (50nM).

La sopravvivenza delle cellule Caco-2 osservata nelle ore successive fra 24 e 48 ore non sembra associata ad una up-regulation dei livelli di heat shock protein. È noto che alti livelli di heat shock proteins (hsps) sono presenti nella linea cellulare Caco-2 anche in assenza di condizioni di stress. In particolare, hsp70 è associata ad una aumentata sopravvivenza in condizione di stress ossidativo o indotto da calore., in più l'over-espressione della hsp70 conferisce protezione nei confronti del trattamento con

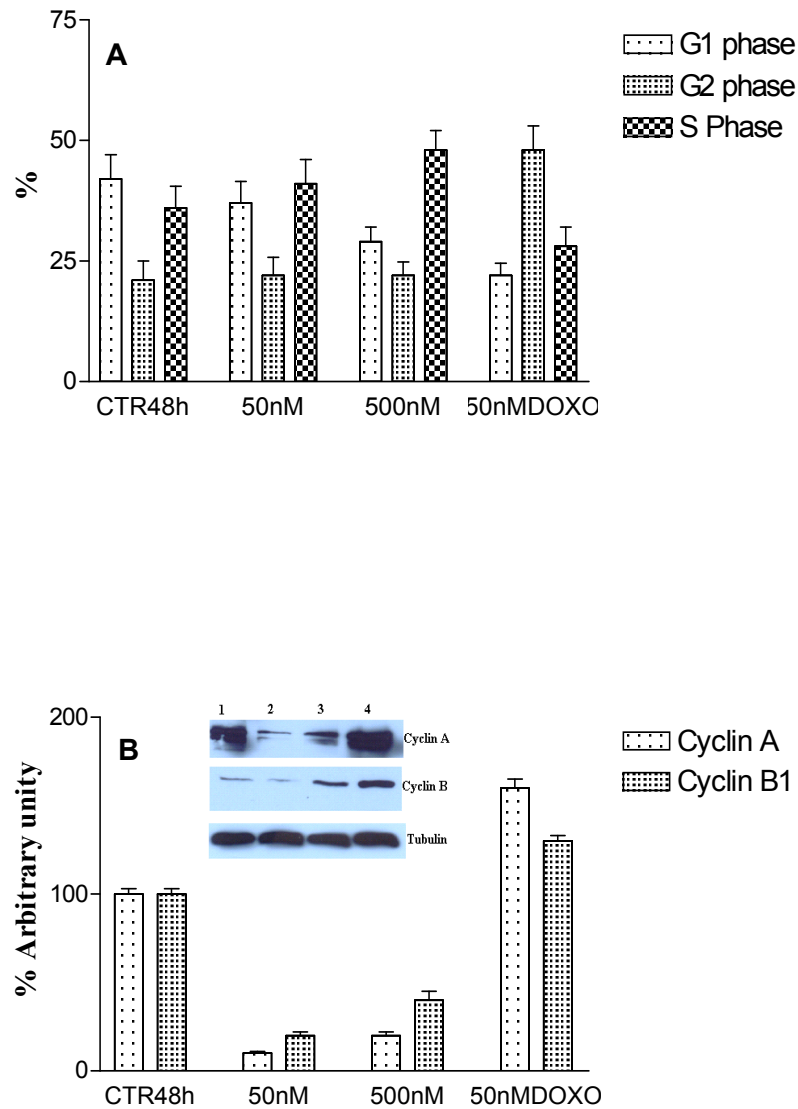
doxorubicina. Nel nostro caso, il primo trattamento con 500nM di DTNQ-Pro conduceva ad un a significativa down-regulation della hsp70 mentre la crescita delle Caco-2 non era influenzata.



**Figure 14.** A) Determinazione dell'espressione di Hsp70 e della protein  $\gamma$ -tubulin delle cellule Caco-2 trattate per 48h con 50nM e 500nM di DTNQ-Pro valutate mediante Western blotting. CTR48h, cellule non trattate. Nel pannello è riportato lo scan delle bande associate con l'espressione di Hsp70 e  $\gamma$ -tubulin.

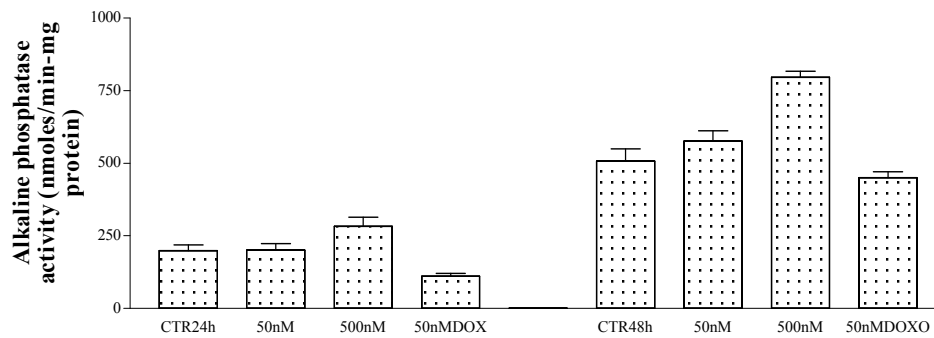
A 48h di trattamento con DTNQ-Pro l'analisi FACs sulla percentuale delle cellule Caco-2 in fase G1, G2 e S hanno mostrato che il nostro composto arresta il ciclo cellulare nella fase S (Figura 15A). Questo arresto viene anche confermato da una diminuzione nell'espressione delle cicline A e B coinvolte nella modulazione del ciclo cellulare a livello del passaggio G1/S (Figura 15B).





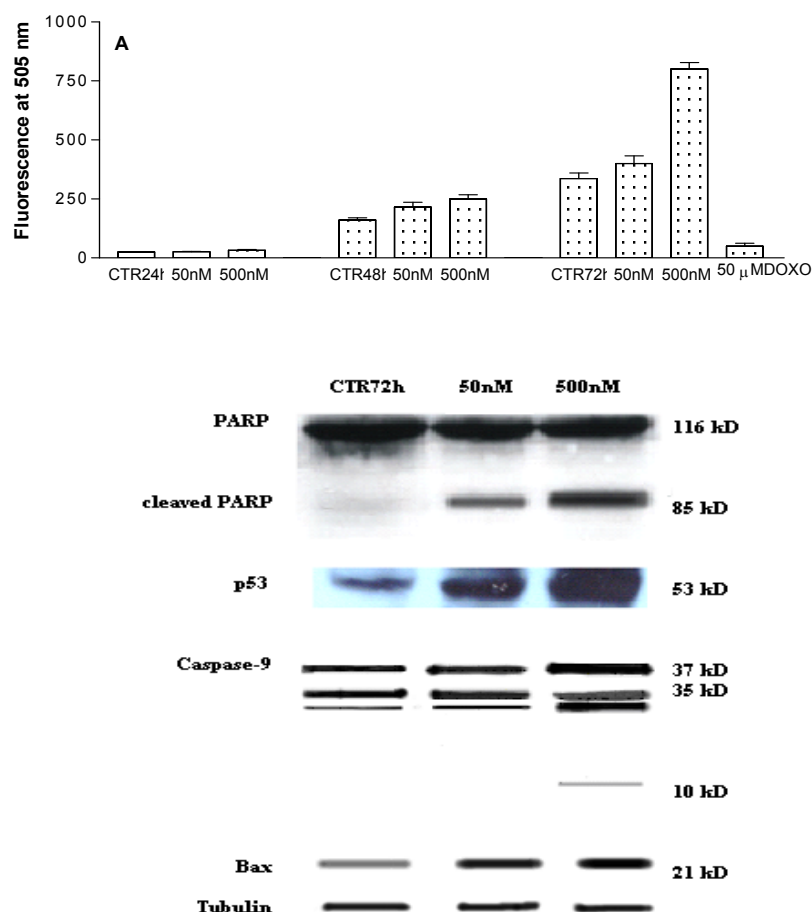
**Figure 15.** A) Effetti del DTNQ-Pro e della doxorubicin sulla distribuzione della popolazione cellulare Caco-2. I dati rappresentano la percentuale di cellule in ogni fase del ciclo cellulare. La distribuzione delle cellule è stata determinata mediante analisi flow cytometric del DNA. Campioni di cellule Caco-2 preconfluenti sono state analizzate dopo 48h di trattamento con 500nM o 50nM DTNQ-Pro e 50nM di doxorubicin. I numeri indicano la percentuale di cellule nella fase G0/G1, S, e G2/M. B) Analisi Western blot dell'espressione di cyclin A, cyclin B e tubulin nelle cellule preconfluent Caco-2 non trattate (linea 1) e trattate con 500nM, 50nM DTNQ-Pro e 50nM di doxorubicin (linee 2, 3, 4, rispettivamente).

Inoltre, il trattamento delle Caco-2 con 500 nM di DTNQ-Pro per 48h aumentava l'attività della fosfatasi alcalina (ALP) del 65% rispetto al controllo (Figura 4), confermando che l'arresto del ciclo cellulare induce differenziazione cellulare. Nelle stesse condizioni, invece, la doxorubicina riduce l'attività dell'ALP.



**Figura 16.** Differenziazione delle cellule Caco-2 misurata dall'attività della fosfatasi alcalina e dopo 24 e 48h dalla somministrazione di 0, 50nM, 500nM di DTNQ-Pro e 50nM di doxorubicin.

La down-regulation della hsp70, insieme alla induzione della differenziazione osservata, indicano che dopo 48h di trattamento la popolazione cellulare è più sensibile agli effetti dannosi di un secondo trattamento con la nostra molecola. Infatti, dopo una seconda dose con 500 nM di DTNQ-Pro e 24 h di trattamento abbiamo osservato un aumento di morte cellulare apoptotica fino al 52% del numero di cellule preesistente. La DTNQ-Pro induce apoptosi (Figura 16) come mostrato dalla attivazione della sequenza metabolica, aumento dell'attività della caspasi 3 e PARP, indotta dal cleavage della caspasi 9.



**Figura 17.** A) DTNQ-Pro induce apoptosis nelle cellule Caco-2 post-confluenti. Le cellule Caco-2 sono state trattate con 500nM o 50nM di DTNQ-Pro per 24, 48 e 72 h seguite da saggio per l'attività della caspasi-3 libera. L'attività della caspase-3 è stata determinata incubando gli estratti interi cellulari con 40 $\mu$ M di substrato per la caspasi-3 substrate e misurando la produzione dell'idrolizzato dei gruppi 7-amido-4-methyl-coumarin (AMC) usando un lettore multi-label plate. I risultati sono rappresentativi di 3 esperimenti separati. B) Cleavage di PARP e caspase-9 come risultato della morte cellulare apoptotica. Cellule post-confluent Caco-2 trattate con 500nM or 50nM di DTNQ-Pro per 72 h. C) Espressione di p53 e Bax, dopo 72 h di cellule post-confluent Caco-2 trattate con 50nM e 500 nM DTNQ-Pro.

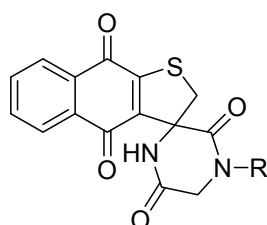
In aggiunta 500nM di DTNQ-Pro induceva una maggiore espressione sia del fattore di trascrizione del p53 che del fattore pro-apoptotico Bax, confermando la possibilità che l'apoptosi mitocondriale possa giocare un ruolo nella citotossicità del nostro composto.

Questi studi dimostrano che la DTNQ-Pro, il primo agente a struttura chinonica ad essere attivo su linee cellulari di tumour al colon, esplica la sua attività citotossica tramite un meccanismo d'azione differente da quello della doxorubicina. Un maggiore ostacolo della chemioterapia è lo sviluppo di popolazioni resistenti, la capacità, quindi, del DTNQ-Pro di

sensibilizzare e ripristinare l'apoptosi di cellule cancerose, fornisce un razionale per l'incorporazione di questo derivato come potenziale agente chemioterapico per i suoi effetti sinergici da inserire in associazione nei protocolli terapeutici

### 2.3.2 SERIE IV

I composti della serie III sono stati valutati, *in vitro*, come potenziali agenti citotossici su colture di linee cellulari MCF-7 e SW620, derivate da carcinomi umani di seno e di colon rispettivamente presso il Dipartimento di Biochimica e Biofisica “Francesco Cetrangolo” della Seconda Università di Napoli.



Compound	R	IC <sub>50</sub> (μM±SD) <sup>a</sup>	
		MCF-7 <sup>b</sup>	SW620 <sup>c</sup>
<b>4a,b</b>	H	0.041±0.005	0.241±0.043
<b>(+)-3'S- 4b</b>	H	0.049±0.001	0.326±0.036
<b>(-)-3'R- 4a</b>	H	0.046±0.001	0.267±0.008
<b>17</b>	CH <sub>3</sub>	0.073±0.001	0.381±0.010
<b>18</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	0.141±0.013	0.670±0.014
<b>19</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	0.170±0.010	0.350±0.014
<b>20</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OH	0.420±0.013	1.950±0.030
<b>21</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SH	0.090±0.007	0.250±0.011
<b>22</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SH	0.380±0.004	1.365±0.030
<b>23</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	0.047±0.047	0.117±0.030
<b>24</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NH <sub>2</sub>	0.299±0.008	1.659±0.020
<b>25a, b</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.031±0.060	0.112±0.300
<b>(+)-3'S- 25a</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.041±0.010	0.170±0.170
<b>(-)-3'R- 25b</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.020±0.040	0.100±0.180
<b>26</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.139±0.009	0.377±0.050
<b>27</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.043±0.010	0.123±0.300
<b>28a, b</b>	ethylpyrrolidine	0.040±0.030	0.119±0.040
<b>(+)-3'S- 28a</b>	ethylpyrrolidine	0.056±0.050	0.141±0.250
<b>(-)-3'R- 28b</b>	ethylpyrrolidine	0.030±0.009	0.098±0.008
<b>29</b>	ethylpiperidine	0.069±0.009	0.198±0.050
<b>30</b>	ethylmorpholine	0.050±0.009	0.164±0.031
<b>31</b>	ethylimidazole	0.116±0.019	1.067±0.100
<b>32</b>	propylimidazole	0.241±0.011	1.423±0.079
<b>Doxorubicin</b>		0.022±0.008	0.178±0.003

**Tabella 8.** Attività citotossica sulle linee cellulari SW 620 e MCF-7.

Dai dati riportati nella tabella 1, in cui sono stati inseriti per confronto la doxorubicina ed il derivato dichetopiperazinico non sostituito **4a,b**, in forma racemica ed enantiomericamente pura, della serie precedente (ottenuto per condensazione della DTNQ con la glicina) possiamo notare che l'introduzione nella posizione N-4 di un piccolo sostituito alchilico come un metile (**17**) o etile (**18**) è tollerata con una perdita di attività di 2-3 volte.

I risultati più interessanti si sono ottenuti con i composti che presentano una funzione aminica distanziata da una catena etilica. I derivati **23**, **25** e **27** sono più attivi della doxorubicina sulla linea di cellule tumorali del colon (SW 620) e di mammella (MCF-7), con valori di  $IC_{50}$  di 117, 112 e 123 rispettivamente, e mantenevano un'attività paragonabile nei confronti della linea cellulare MCF-7, con valori di  $IC_{50}$  di 47, 31 e 43 rispettivamente.

I livelli di attività sono mantenuti anche nel caso della sostituzione del gruppo amminico con diversi eterocicli contenenti azoto. I derivati contenenti residui pirrolidin- (**28**), piperidin- (**29**) o morfolin- (**30**) etilici hanno mostrato attività citotossica ( $IC_{50}$ ) nel range 40-60 nM sulla linea cellulare MCF-7. In più, il derivato pirrolidin- etil **28** è il più attivo sulle cellule SW-620 ( $IC_{50}=119$  nM).

In generale, i risultati ottenuti indicano che solo i composti dotati di un gruppo amminico carico positivamente a pH fisiologico forniscono i migliori risultati per quanto riguarda la citotossicità. Infatti, i congeneri con un gruppo tiolico o idrossilico sono meno potenti comparati alle analoghe ammine primarie e terziarie. Il composto contenente un gruppo imidazolico è 3 volte meno potente rispetto al corrispondente con un gruppo pirrolidinico. In questo caso, possiamo supporre che la natura aromatica dell'anello eterociclico, relativamente rigido e più ricco di elettroni paragonato al ciclo alchilico della pirrolidina, non è ben tollerata nel target molecolare.

I risultati nella tabella 1 hanno mostrato altre importanti relazioni struttura-attività per questa serie di derivati.

1. La lunghezza della catena laterale, determinata dal numero di gruppi metilenici che separano il sistema cromoforo dal gruppo amminico protonabile, sembra avere un importante effetto sulla citotossicità. Infatti, i corrispondenti derivati contenenti una catena propilica sono 3-6 volte meno potenti dei corrispondenti analoghi con una catena etilica. Confrontando i risultati ottenuti dalla serie idantoinica **II**, in cui la catena laterale non

2. La configurazione del C-3' ha una debole ma significativa influenza sull'attività citotossica di questi composti. Mentre gli enantiomeri non sostituiti S-3 e R-3 hanno mostrato un'attività simile al corrispondente composto racemico **4a,b** (IC<sub>50</sub>=49-46 e 41 rispettivamente), gli enantiomeri puri 3'-R-**25a** e 3'-R-**28a** (IC<sub>50</sub>= 20 e 30 nM, rispettivamente) sono circa 2 volte più potenti dei corrispondenti enantiomeri 3'-S (IC<sub>50</sub>= 41 e 56 nM, rispettivamente) sulla linea cellulare MCF-7. Inoltre, questi composti sono più attivi della doxorubicina sulla linea cellulare SW 620 (IC<sub>50</sub> 100 e 98 vs 178 nM).

La selettività indotta dalla stereochimica del C-3' in questi nuovi derivati spirodichetopiperazinici sostituiti in 4 non è così determinante come osservato negli analoghi della serie precedente sostituita sul C-3.

Per determinare lo spettro antitumorale e del profilo di farmaco-resistenza, i composti **25** e **28** e le loro forme enantiomeriche pure 3'-S, 3'-R sono stati esaminati su alcune linee tumorali di cellule umane (tabella 9), compresa la linea cellulare resistente alla doxorubicina (MCF-7/Dx).

Compound	IC <sub>50</sub> (μM±SD) <sup>a</sup>					
	A549 lung	HEK-293 kidney	M-14 melanoma	HeLa cervical	MCF-7 ovarian	MCF-7/Dx
25a, b	0.464±0.020	0.206±0.010	0.341±0.010	0.398±0.030	0.031±0.012	0.109±0.020
(+)-3'S- 25a	0.454 ± 0.05	0.220±0.030	0.356±0.030	0.400±0.040	0.041±0.008	0.122±0.020
(-)-3'R- 25b	0.432 ± 0.03	0.196±0.030	0.330±0.010	0.310±0.020	0.020±0.008	0.080±0.020
28a b	0.190±0.008	0.211±0.010	0.237±0.012	0.445±0.020	0.040±0.010	0.236±0.020
(+)-3'S- 28a	0.205±0.020	0.220±0.029	0.260±0.030	0.460±0.030	0.056±0.008	0.240±0.020
(-)-3'R- 28b	0.180±0.020	0.195±0.013	0.230±0.030	0.401±0.030	0.030±0.008	0.130±0.020
Doxorubicin	0.031±0.008	0.064±0.010	0.820±0.100	1.009±0.070	0.022±0.008	5.300±0.40

**Tabella 9.** Inibizione di varie linee cellulari neoplastiche da parte dei composti selezionati.

Nei confronti dei sistemi di cellule tumorali umane A549 (polmone), HEK-293 (rene), M14 (melanoma) e HeLa (adenocarcinoma cervicale), tutti hanno mostrato marcata attività citotossica a concentrazioni submicromolari. Il composto **28** e il suo enantiomero sono

risultati i più attivi contro A549 e M14 con valori di IC<sub>50</sub> nel range 0.18-0.24  $\mu$ M. Il derivato **25** e il suo enantiomero hanno mostrato anche potente attività contro la linea cellulare HEK-293(IC<sub>50</sub>=0.2  $\mu$ M).

Per valutare il potenziale citotossici dei nostri composti su linee cellulare resistenti al trattamento con chemioterapici classici, abbiamo esaminato il loro comportamento nel confronto della crescita e la progressione del ciclo cellulare nella linea CaCo-2.<sup>28</sup>

Treatment (h)	% cell proliferation					
	Control	Doxorubicin	25b	25a	28b	28a
24	100±9	60±8	46±7	59±6	56±8	76±5
48	100±2	100±5	60±7	80±4	72±5	100±5
72	100±1	130±7	36±3	110±1	46±1	143±1

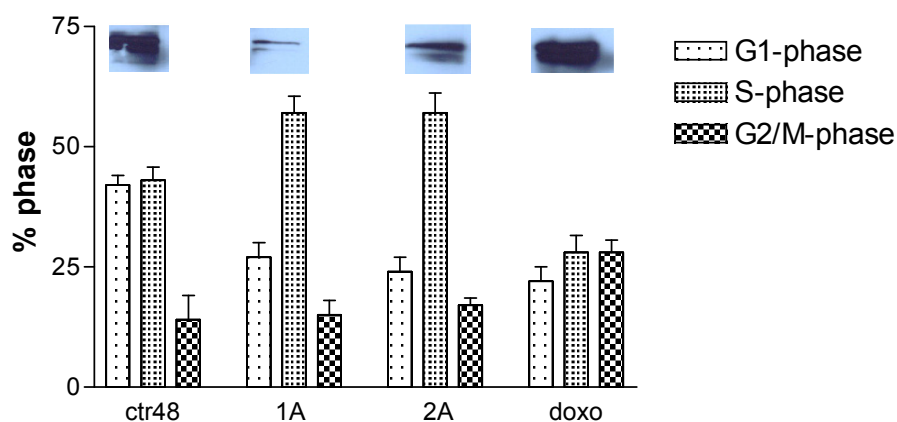
**Tabella 10** Effetti della doxorubicina e dei derivati 25 e 28 sulla crescita delle cellule CaCo-2.

La proliferazione delle cellule CaCo-2 è stata valutata sia a 24 e 48 ore dopo trattamento con 50nM dei nostri composti che a 72 ore dopo una seconda somministrazione dei composti che permette osservare l'eventuale formazione di una popolazione cellulare e farmaco-resistente. Come indicato in Tabella 3, dove è stata aggiunta i valori di citotossicità della doxorubicina, i risultati hanno mostrato una significativa differenza tra le CaCo-2 trattate con gli enantiomeri R ed S di **25** e **28**. Un notevole calo del numero totale di cellule è stato notato solo nel caso delle cellule CaCo-2 incubate per 72 h con i derivati 3'R-**25b** e 3'R-**28b**. Allo stesso tempo e analogamente alla doxorubicina i corrispondenti isomeri 3'S-**25a** e 3'S-**28a** hanno indotto resistenza nelle CaCo-2 e non sono antiproliferativi.

L'inibizione della crescita cellulare sembra essere correlata alla perturbazione del ciclo cellulare indotta dal trattamento con 50nM di 3'R-**25b**, 3'R-**28b**. Infatti, come indicato nella figura 8 il trattamento, con i nostri derivati ha portato ad un accumulo di cellule nella fase S (57% delle cellule) e ad un decremento concomitante nella fase G1, mentre, alla stessa concentrazione, la doxorubicina induce un incremento della percentuale nella fase G2/M(28%). Questi risultati sono in accordo con il decremento dell'espressione della ciclina A indicando che la progressione del ciclo cellulare durante la fase S è fortemente



ritardata.<sup>29</sup> Contrariamente, la doxorubicina non ha mostrato alcuna attività inibitoria sull'espressione della ciclina A.



**Figura 18.** Effetti della doxorubicina, 3'R-4f(1A) e 3'R-4g(2A) sulla distribuzione della popolazione cellulare.

I risultati preliminari hanno suggerito che l'inibizione della proliferazione cellulare è indotta, almeno in parte, dall'esposizione delle cellule ai composti 3'R-25b e 3'R-25b nella fase S e dal conseguente ritardo della progressione del ciclo cellulare nelle cellule sensibili. Ulteriori studio della determinazione del meccanismo molecolare alla base della loro attività citotossica sono in fase di studio.

### **3. SINTESI PEPTIDOMIMETICA**

### **3.1.PEPTIDOMIMETICI**

I peptidi costituiscono una classe di molecole di notevole importanza per la ricerca biomedica, chimico-farmaceutica e biotecnologia.<sup>30</sup> Molti neurotrasmettitori, neuromodulatori e ormoni coinvolti in processi di trasduzione del segnale (ad es. Vasopressina, Calcitonina, ACTH) sono, infatti, di natura peptidica e possono avere attività terapeutica. Tuttavia l'impiego dei peptidi come farmaci è limitato da numerosi svantaggi evidenziati dopo la somministrazione, come:

- Bassa stabilità metabolica, dovuta all'azione di peptidasi o idrolasi che scindono il legame peptidico.

- Bassa biodisponibilità orale, dovuta all'elevato peso molecolare

- Impossibilità di attraversare la barriera ematoencefalica.

- Possibili effetti collaterali, dovuta alla flessibilità della molecola che è in grado d'interagire non solo con il proprio bersaglio biologico ma anche con sottotipi recettoriali.

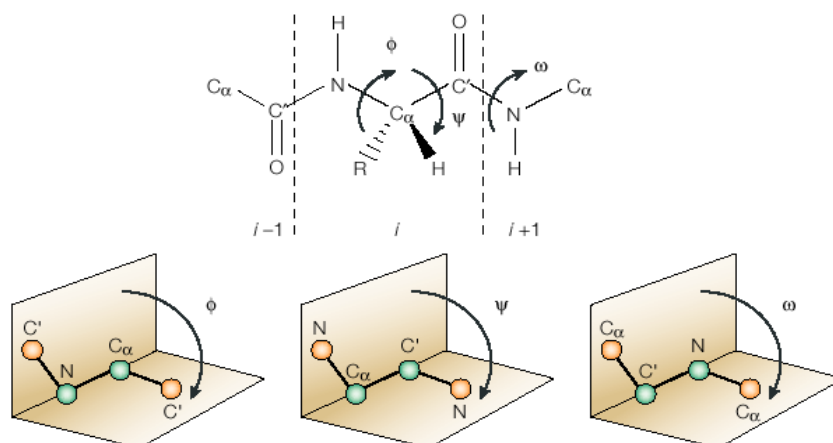
Per questi motivi si è cercato di sintetizzare molecole definite "peptidomimetiche, che, mantenendo l'attività biologica del peptide, presentano caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche migliori rispetto ai peptici. La progettazione di questo ipo di entità chimica implica una approfondita conoscenza delle caratteristiche strutturali e funzionali del peptide che si vuole mimare

L'evento iniziale essenziale per l'attivazione od il blocco di un qualunque processo biologico è il riconoscimento molecolare, che si tratta di un'interazione specifica tra una regione superficiale del ligando, definita farmacoforo, con la superficie complementare della molecola accettrice o del recettore. Nel caso di peptidi e proteine, tale regione può essere costituita sia da una sequenza continua di aminoacidi che da residui aminoacidici separati tra loro nella sequenza primaria, ma vicini tra loro nella struttura tridimensionale del peptide.<sup>31</sup>

Il backbone peptidico serve, quindi, sia come scaffold per i gruppi in catena laterale sia, in alcuni casi, come donatore e/o accettore di legami ad idrogeno coinvolti nell'interazione molecolare.

Per questo motivo la comprensione dei fattori che determinano in un polipeptide la struttura tridimensionale sia del backbone che delle catene laterali risulta fondamentale nella progettazione e sviluppo di peptidomimetici.<sup>32</sup>

Consideriamo in generale le caratteristiche di una struttura peptidica.



**Figura 19.** Angolo torsionali del legame peptidico

Il legame peptico ha la caratteristica di essere rigido e planare, avendo carattere parziale di doppio legame, è impedita, quindi, la rotazione intorno all'angolo  $\omega$ . L'angolo  $\omega$  indica la deviazione dalla planarità del legame peptidico, se  $\omega$  è di  $180^\circ$  il legame peptidico sarà trans, ossia l'ossigeno del carbonio carbonilico e l'idrogeno dell'azoto sono da parti opposte. Se invece  $\omega$  ha una rotazione di  $0^\circ$  la conformazione del legame peptidico sarà cis, con l'ossigeno carbonilico dallo stesso lato dell'idrogeno dell'azoto in  $\alpha$ . Ogni legame peptidico ha 2 gradi di libertà individuati da 2 angoli, l'angolo  $\Phi$  che indica la rotazione intorno al legame N-C $\alpha$  e l'angolo  $\phi$  che indica la rotazione intorno al legame C $\alpha$ -C'. Bisogna considerare anche l'angolo  $\chi$  che indica la rotazione intorno al legame C $\alpha$ -C $\beta$ . E' proprio sulla rotazione di questi angoli che andiamo ad apportare delle modifiche, in modo da ridurre la libertà rotazionale, migliorando così le caratteristiche farmacocinetiche di molecole peptidiche per ottenere molecole peptidomimetiche.

Le strutture secondarie dei polipeptidi si formano quando un certo numero di residui consecutivi presentano valori uguali degli angoli  $\Phi$  e  $\phi$ . La struttura della maggior parte

delle proteine risulta dalla combinazione di più elementi di struttura secondaria,  $\alpha$ -elica e  $\beta$ -sheet collegati da regioni di lunghezza variabile e forma irregolare (*loop* o *turn*). Queste regioni si trovano sulla superficie della molecola ed i gruppi CO e NH della catena principale presenti in questi loop, in genere non formano legami idrogeno tra loro ma si trovano esposti al solvente e possono interagire con ligandi esterni.

Mentre le strutture  $\alpha$ -elica e  $\beta$ -sheet hanno la proprietà che residui successivi assumono valori simili degli angoli torsionali  $\Phi$  e  $\phi$ , i turns hanno una particolare successione di valori differenti per ciascun residuo.

Le  $\alpha$ -eliche sono presenti quando una serie di aminoacidi successivi presentano tutti coppie di angoli  $\Phi$  e  $\phi$  i cui valori sono compresi approssimativamente tra i  $-60^\circ$  e  $-50^\circ$ . Nelle proteine l'elica è quasi sempre destrorsa e solo occasionalmente si trovano brevi tratti di 3-5 residui di eliche sinistrorse, perché, in presenza di L-aminoacidi, una elica sinistrorsa presenterebbe le catene laterali in stretta vicinanza con i gruppi CO.

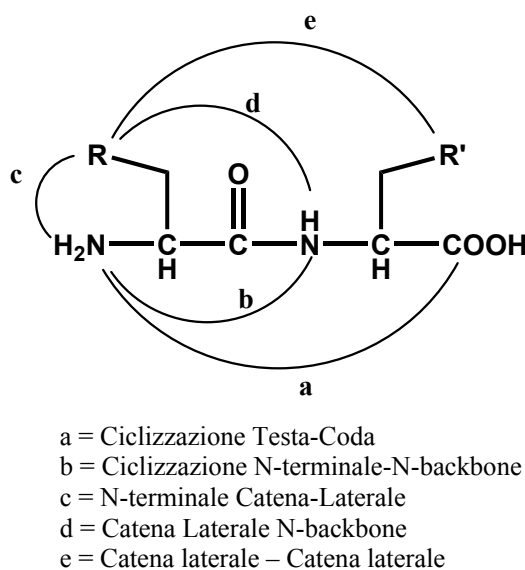
I  $\beta$ -sheet, a differenza dell' $\alpha$ -elica, è costituito dalla combinazione di più regioni, dette filamenti o  $\beta$ -strand, di 5-10 residui della catena polipeptidica. Questi  $\beta$ -strand si dispongono parallelamente in modo da formare legami idrogeno tra i gruppi CO di un filamento ed i gruppi NH di un altro filamento.

I turns sono strutture più piccole costituite al massimo da 4-5 residui consecutivi<sup>33</sup>, caratterizzati da una particolare successione di valori differenti degli angoli torsionali  $\Phi$  e  $\psi$  per ciascun residuo. Negli anni '60 Venkatachalan individuò 3 tipi generali di turns, chiamati poi  $\beta$ -turns, stabilizzati da un legame idrogeno nella catena principale tra il gruppo CO del residui  $i$ -esimo ed il gruppo NH  $i+3$ . In aggiunta ai precedenti 3 tipi, furono caratterizzati altri 5 tipi, come i  $\gamma$ -turns e  $\alpha$ -turns.

Prendendo in considerazione gli elementi strutturali che determinano la geometria dell'interazione del peptide con i suoi target biologici, la progettazione di peptidomimetici si avvale di strategie che prevedono:

- 1) Introduzione di aminoacidi non naturali conformazionalmente vincolanti<sup>34</sup>, in grado di ridurre la libertà rotazionale degli angoli  $\Phi$  e  $\phi$  in modo che la molecola assuma solo la conformazione necessaria per l'interazione con il bersaglio biologico.

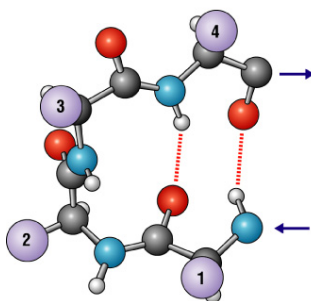
2) Ciclizzazioni che permettono non solo di aumentare la stabilità metabolica ma, spesso, anche la selettività recettoriale<sup>35</sup>.



**Figura 20** Esempi di ciclizzazioni

3) Introduzione di strutture turns mimetiche, in modo tale conferire una maggiore rigidità a queste molecole.

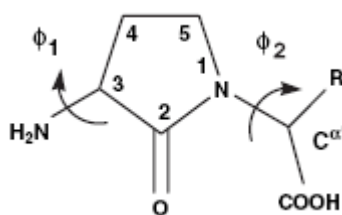
Le strutture  $\beta$ -turn nei peptidi hanno, solitamente, un ruolo molto importante nel riconoscimento molecolare,<sup>36-39</sup> e rappresentano, quindi, un motivo strutturale molto attraente per lo sviluppo di peptidomimetici a basso peso molecolare conformazionalmente ristretto. Queste restrizioni spesso forniscono profili metabolici migliori rispetto ai corrispondenti peptidi lineari, inoltre possono fornire numerose informazioni riguardanti l'interazione tra il recettore ed il ligando endogeno.<sup>40-44</sup>



**Figura 21**  $\beta$ -turn

Diversi sistemi non-peptidici sono stati progettati per mimare i differenti tipi di  $\beta$ -turns,<sup>45-50</sup> tra queste il **lattame di Freidinger** si è dimostrato una struttura ideale per la progettazione e di diversi target farmacologici, soprattutto inibitori di enzimi peptidasici.<sup>51</sup> Tale ciclizzazione dello scheletro peptidico fissa il legame amidico nella forma *trans*-rotamerica,<sup>52-55</sup> impone diverse limiti sulla rotazione  $\Psi_1$ , ed influenza gli angoli torsionali  $\phi_1$  e  $\phi_2$ . Diverse strategie sintetiche sono state sviluppate per il lattame di Freidinger, ma nessuno ha fornito una facile sintesi stereoselettiva per la sintesi del lattame di diverse grandezze.<sup>55-58</sup>

Il nostro gruppo di ricerca ha sviluppato una nuova metodologia sintetica del lattame di Freidinger, basata su una reazione di N-alchilazione tra un aminoacido iododerivato,<sup>59</sup> come agente elettrofilo, ed il gruppo amminico di un secondo aminoacido legato su un'opportuna resina e successiva lattamizzazione intramolecolare.<sup>60</sup>



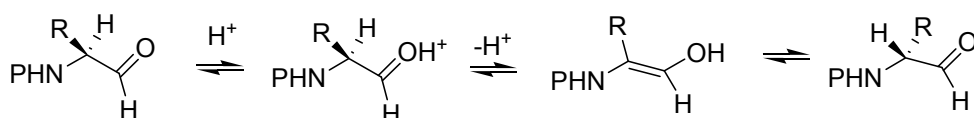
**Figura 22** Lattame di Freidinger

4) Sostituzioni del legame peptidico con isosteri del legame ammidico,<sup>61</sup> in modo da aumentare la stabilità metabolica, in quanto target naturale di molti enzimi proteolitici. Alcuni esempi sono riportati in tabella 1:

N-sostituito	$\Psi$ [CONR]
Retroinverso	$\Psi$ [NHCO]
Estere	$\Psi$ [CO <sub>2</sub> ]
Tioammide	$\Psi$ [CSNH]
Sulfonammido	$\Psi$ [SO <sub>2</sub> NH]
<b>Metilenamminio</b>	<b><math>\Psi</math> [CH<sub>2</sub>NH]</b>
Cianometilammino	$\Psi$ [CH(CN)NH]
Chetometilene	$\Psi$ [COCH <sub>2</sub> ]
Chetometilenamminico	$\Psi$ [COCH <sub>2</sub> NH]
Metilenetere	$\Psi$ [CH <sub>2</sub> O]
Idrossietilene	$\Psi$ [CH(OH)CH <sub>2</sub> ]
Tiometilenetere	$\Psi$ [CH <sub>2</sub> S]
Dimetilene o carba	$\Psi$ [CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ]
Cis e Trans olefinico	$\Psi$ [CH=CH]

**Tabella 11:** I più comuni surrogati del legame peptidico

L'importanza del legame metilenamminico  $\Psi$ [CH<sub>2</sub>NH] è ampiamente dimostrata, in letteratura, dal suo impiego per la progettazione di inibitori enzimatici pseudopeptidici e per lo sviluppo di diversi antagonisti recettoriali,<sup>62-64</sup> ma attualmente la principale metodica sintetica di questo isostero è tramite alchilazione riduttiva tra una funzione amminica di un aminoacido ed il derivato aldeidico di un altro aminoacido.<sup>65,66</sup> Questa metodica è limitata dall'instabilità chimica di amino-aldeidi,<sup>67-70</sup> in quanto facilmente racemizzano,<sup>71</sup> tramite equilibrio cheto-enolico, e portano quindi a formazione di sottoprodotti epimerizzati. Fig .

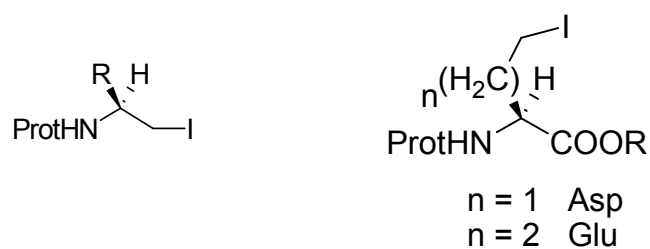


**Figura 23** epimerizzazione delle aminoaldeidi tramite equilibrio cheto-enolico

Per questi motivi, durante il mio corso di dottorato mi sono interessato di una nuova metodica per la sintesi del legame aminometilene [-CONH- → -CH<sub>2</sub>NH], che prevede una reazione di sostituzione nucleofila di β-iodoamine N-protette enantiomericamente pure con α-amino-esteri protetti.<sup>72</sup>

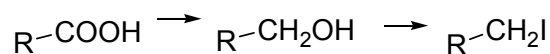
Sia il lattame di Freidinger che il legame aminometilenico sono stati sintetizzati da un comune building blocks progettato e sintetizzato nei nostri laboratori, gli aminoacidi iododerivati.





**Figura 24 .** Struttura generale di amminoacidi iododerivati N<sup>α</sup>-protetti.

Il metodo di sintesi proposto consente di convertire gli  $\alpha$ -amminoacidi naturali in  $\beta$ - o  $\gamma$ -iodoammine N-protette con alte rese e con materiali di partenza relativamente poco costosi. Tale strategia sintetica risulta particolarmente interessante per l'applicazione delle microonde in quanto gli iododerivati risultano particolarmente adatti per reazioni di sostituzione nucleofila, ampiamente descritte con l'utilizzo delle microonde. Lo schema di sintesi è riportato nella Figura 17 prevede la riduzione della funzione carbossilica in  $\alpha$  od in catena laterali (per Asp o Glu) e conversione dell'alcol in ioduro.

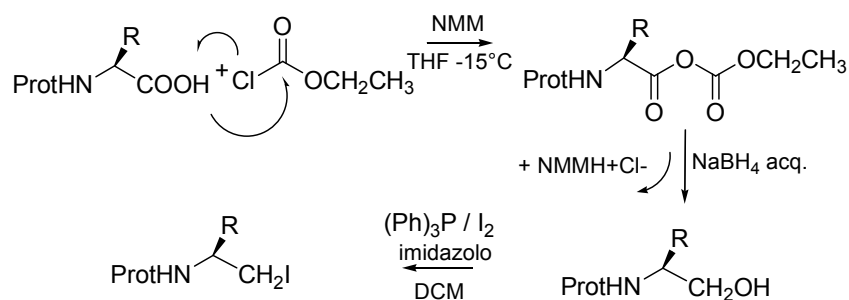


**Figura 25**

## 3.2 CHIMICA

### 3.2.1 $\beta$ -IODOAMMINE

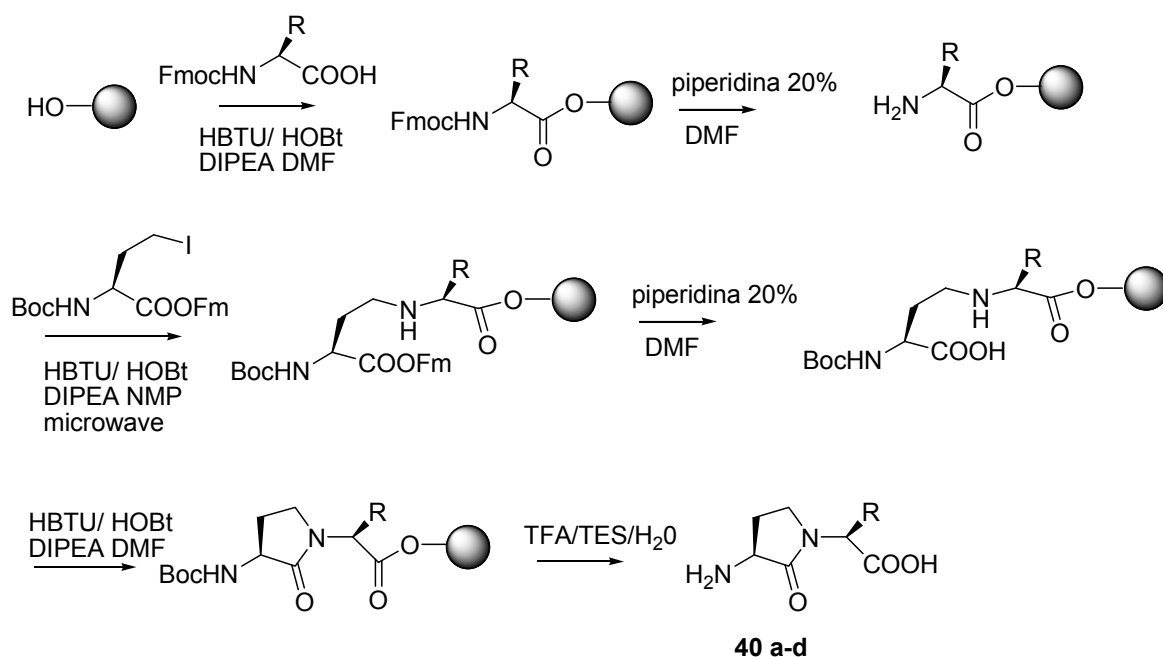
Le  $\beta$ -iodoammine  $N^\alpha$ -protette sono preparate dai corrispondenti  $\alpha$ -amminoacidi  $N^\alpha$ -protetti in due step<sup>73</sup> che prevedono la riduzione della funzione carbossilica dell'amminoacido di partenza mediante riduzione dell'anidride mista ottenuta utilizzando etilcloroformiato in presenza di N-metil-morfolina, con  $\text{NaBH}_4$ , e la conversione del risultante  $\beta$ -amminioalcol  $N$ -protetto nel corrispondente  $\beta$ -amminioduro  $N^\alpha$ -protetto mediante complesso trifenilfosfina/iodio in presenza di imidazolo, utilizzato come trappola protonica e che consente la conversione in  $\beta$ -amminioduri  $N$ -protetti anche di substrati contenenti protezioni acido labili come quella *tert*-butilossicarbonilica e quella tritilica:



**Schema 23** Formazio delle  $\beta$ -iodoamine

### 3.2.2 LATTAME DI FREIDINGER

Il lattame di Freidinger è stato sintetizzato secondo lo schema illustrato, mediante metodica in fase solida utilizzando aminoacidi protetti sulla funzione amminica con il gruppo Fmoc, e resina Wang con grado di sostituzione di 0.70 mmol/g.



Schema 24

Dopo aver fatto rigonfiare la resina in DMF, è stato effettuato il *coupling* del primo aminoacido, utilizzando HBTU (3 eq.) per un'ora. La deprotezione del gruppo Fmoc è stata effettuata utilizzando una soluzione di piperidina al 20% in DMF. Dopo opportuni lavaggi con metanolo, la resina è stata asciugata *in vacuo* e trasferita nel nostro sintetizzatore per le microonde per effettuare la reazione successiva di alchilazione con lo iodo-derivato in catena laterale dell' Asp, il (2S)-9-fluorenylmethyl- 2-[(t-butoxycarbonyl) amino]- 4-iodobutanoate (2 eq.), in NMP, utilizzando 2 eq. di Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> come base per 1 ora.

Dopo deprotezione del fluorenilmetilestere con piperidina al 25% in DMF, lo step di ciclizzazione viene effettuato utilizzando HOBt/HBTU come agenti attivanti per 3 ore. Successivamente il *cleavage* dalla resina viene effettuato con una miscela TFA/H<sub>2</sub>O/TES (99.5/0.5/0.5%) per 3 ore a temperatura ambiente. Dopo filtrazione della resina, il solvente

viene concentrato sotto pressione ed il peptide è stato precipitato con etere etilico. Il grezzo di reazione è stato purificato mediante (RP)-HPLC con colonna C-18, utilizzando un gradiente di acetonitrile ed acqua all'1% di TFA, fornendo i corrispondenti dipeptidi contenenti il lattame di Freidinger in buone rese (45-52%). Caratterizzazione mediante HPLC analitico e spettrometria di massa hanno confermato i nostri derivati.

Allo scopo di ottimizzare le condizioni di reazione, abbiamo esaminato come la potenza di irradiazione, il solvente e la temperatura potessero influire lo step di sostituzione nucleofila nella sintesi del derivato 40a. Come mostrato in tabella, le rese migliori si sono ottenute utilizzando NMP come solvente, con una potenza di 250 W, 60° C, per 40 minuti.

**Table 1. Optimal condition for compound**

Solvent	Time (min)	Yield (%)
DMF	20	20
DMF	40	35
DMF	60	35
DMF/NMP	40	40
NMP	40	52

a. Temperature was fixed at 60 °C, 250 W, and as base of Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> was used.  
DMF, *N,N*-dimethylformamide; NMP, *N*-methyl-pyrrolidone.

**Tabella 12** Condizioni ottimali per la sintesi del lattame

In queste condizioni non è stata riscontrata nessuna racemizzazione rivelabile in tutti i composti sintetizzati, ottenuti a partire da diversi aminoacidi ancorati sulla resina, Gly, Phe, Lys e Asp, scelti in base alle loro differenti caratteristiche chimico-fisiche, con rese superiori del 45% per tutti i derivati.

Tabella

**Table 2.** Physicochemical properties of synthesized compounds<sup>a</sup>

Compound	R	Yield	HPLC ( $k'$ )	FAB-MS (M + H) <sup>+</sup>	
				Calculated	Observed
40 a	H	52	3.12	158.16	158.78
40 b	CH <sub>2</sub> COOH	45	3.22	216.19	216.66
40 c	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>	48	3.45	229.28	229.79
40 d	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	45	3.67	248.28	248.98

a. Temperature was fixed at 60 °C, 250 W.

b. HPLC ( $k'$ ) = [(Peptide retention time – Solvent retention time)/Solvent retention time] in a solvent system as reported in Experimental Procedures Section.

HPLC, high-performance liquid chromatography; FAB-MS, fast-atom bombardment mass spectrometry.

**Tabella 13** Proprietà fisiche dei composti sintetizzati

### 3.2.3 LEGAME AMINOMETILENICO

La nuova strategia sintetica da noi proposta per la formazione del legame aminometilenico prevede una reazione di sostituzione nucleofila di  $\beta$ -iodoamine N-protette con amino-esteri protetti.

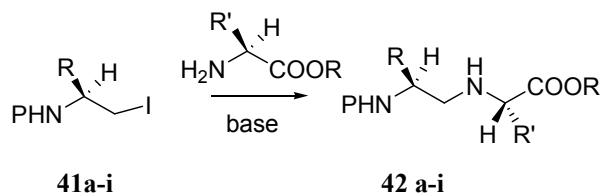


Figura 26

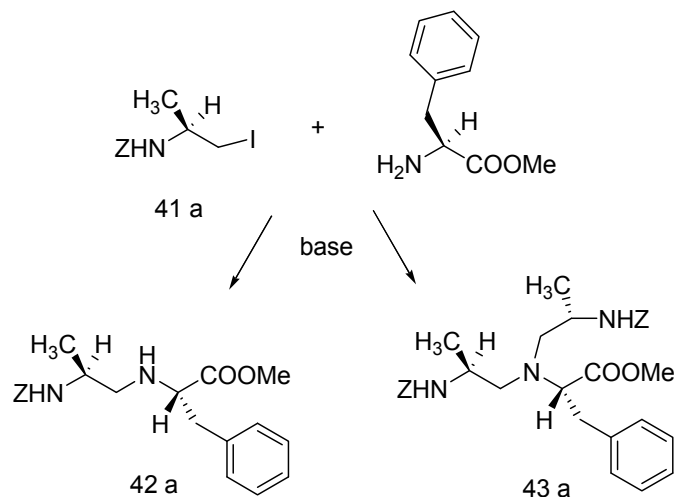
Seguendo questa procedura sintetica, sono state sintetizzate diverse  $\beta$ -iodoamine protette sulla funzione amminica con gruppi Fmoc, Boc o Z, a partire da diversi aminoacidi, come Ala, Val, Phe, Lys e Asp, scelti in base alla loro diversa catena laterale, rappresentativa di residui alifatici, aromatici e polari. (Tabella 14)

Table 1  
N-Protected  $\beta$ -iodoamine derivatives used in this study

	41a		41f
	41b		41g
	41c		41h
	41b		41i
	41c		

Tabella 14  $\beta$ -iodoamine N-protette utilizzate

Sono stati effettuati studi preliminari sull'influenza della base ( $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , TEA e DBU) e dei solventi (DMF, NMP, DMSO, DCM, THF e actone) sulla reazione tra lo iododerivato della Z-Ala e la H-Phe-OMe.



**Schema 25**

Come mostrato in tabella 15, dopo 16 ore la base  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  fornisce le rese maggiori e la migliore selettività nella formazione del pseudodipeptide monoalchilato, senza formare sottoprodotti di dialchilazione,  $\text{K}_2\text{CO}_3$  e TEA forniscono rese minori con una piccola quantità di prodotto dialchilato, mentre la DBU risulta inefficace probabilmente per decomposizione della  $\beta$ -iodoammina di partenza.

Composti	Resa (%)			
	$\text{Cs}_2\text{CO}_3$	$\text{K}_2\text{CO}_3$	TEA	DBU
42 a	85	35	15	<5
43 a	non rilevato	15	8	0

**Tabella 15** N-alchilazione della H-Phe-OMe utilizzando diverse basi

Confrontando diversi solventi, la DMF è risultato essere il migliore per la reazione. NMP e DMSO forniscono rese minori mentre DCM, THF e acetone si sono dimostrati non adatti per questa reazione. (Tabella 16)

Composti	Resa (%)			
	DMF	NMP	DMSO	DCM, THF, acetone
42 a	85	70	60	5
43 a	non rilevato	15	8	0

**Tabella 16** N-alchilazione della H-Phe-OMe utilizzando diversi solventi

Secondo questi risultati, la reazione di **41a** con H-Phe-OMe in DMF a temperatura ambiente utilizzando  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  come base fornisce lo pseudodipeptide Z-Ala- $\psi$ [CH<sub>2</sub>NH] Phe-OMe con 80% di resa dopo purificazione cromatografia.

Prodotti di dialchilazione o diastereoisomeri dovuti a racemizzazione non sono stati rilevati mediante HPLC e <sup>1</sup>H NMR del grezzo di reazione.<sup>74</sup> Una volta individuate le condizioni ottimali per quanto riguarda la natura della base ed il solvente da utilizzare, abbiamo indagato sulla possibilità di utilizzare le microonde. In queste condizioni abbiamo osservato una notevole riduzione dei tempi di reazione, passando da 16 ad 1 ora, con minima influenza sulla resa.

Abbiamo, quindi, sottoposto a reazione di alchilazione diverse  $\beta$ -iodoamine N-protette, ed aminoesteri, allo scopo di validare questo metodo. Come mostrato in tabella questo metodo sviluppato è risultato compatibile con tutte le  $\beta$ -iodoamine utilizzate, senza influenza della natura dei gruppi protettori della funzione amminica.

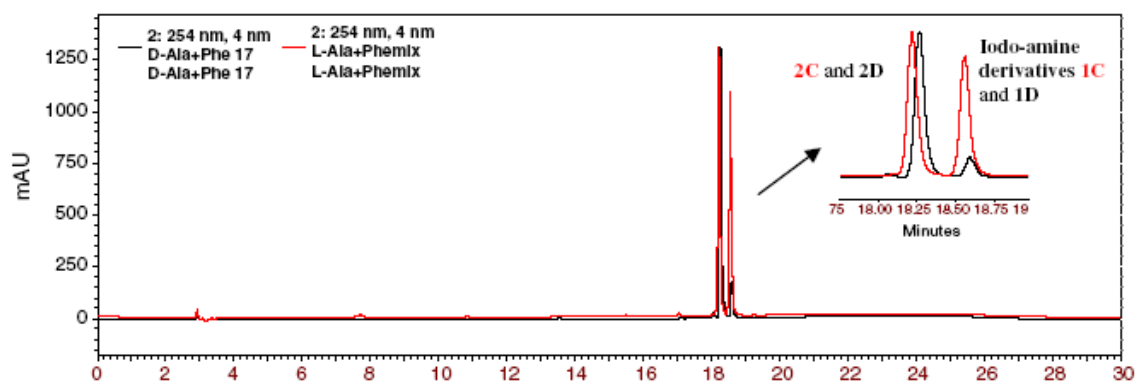


$\beta$ -iodoamine	amine	42	prodotto	resa(%)
41a	H-Phe-OMe	42a	Z-Ala- $\psi$ [CH <sub>2</sub> NH]Phe-OMe	80
	H-Pro-OBz	42aa	Z-Ala- $\psi$ [CH <sub>2</sub> NH]Pro-OBz	75
41b	H-Phe-OMe	42b	Z-Val- $\psi$ [CH <sub>2</sub> NH]Phe-OMe	75
41c	H-Phe-OMe	42c	Fmoc-Ala $\psi$ [CH <sub>2</sub> NH]Phe-OMe	86
	H-Pro-OBz	42cc	Fmoc-Ala $\psi$ [CH <sub>2</sub> NH]Pro-OBz	70
41d	H-Phe-OMe	42d	Fmoc-DAla $\psi$ [CH <sub>2</sub> NH]Phe-OMe	83
41e	H-Phe-OMe	42e	Fmoc-Lys(Boc) $\psi$ [CH <sub>2</sub> NH]Phe-OMe	70
41f	H-Phe-OMe	42f	Boc-Ala- $\psi$ [CH <sub>2</sub> NH]Phe-OMe	75
41g	H-Pro-OMe	42g	Boc-Phe- $\psi$ [CH <sub>2</sub> NH]Pro-OMe	75
41h	H-Phe-OMe	42h	Boc-Asp(OMe) $\psi$ [CH <sub>2</sub> NH]Pre-OMe	83
41i	H-Pro-OBz	42i	Boc-Pro $\psi$ [CH <sub>2</sub> NH]Pro-OMe	70

**Tabella 17** Rese dei prodotti finali

Per dimostrare la compatibilità del metodo, abbiamo utilizzato come substrati per la N-alchilazione, H-Pro-OBz e H-Pro-OMe, in quanto è dimostrato che l'introduzione di un legame amidico ridotto tra residui di Phe e Pro, mediante alchilazione riduttiva classica dell'azoto della prolina con l'aldeide della fenilalanina, porta ad epimerizzazione del residuo della Phe<sup>75</sup>. Nella metodica nostra, invece, non sono stati individuati prodotti di racemizzazione.

Infine, anche la chiralità della  $\beta$ -iodoamina di partenza non ha influenza sulla reazione, HPLC analitico dei grezzi di reazione dei composti **42c** e **42d** evidenziano nessuna racemizzazione in queste condizione di reazione.



**Figura 27** Sovrapposizione dei profili di HPLC analitico dei grezzi di reazione dei composti **42c** e **42d**

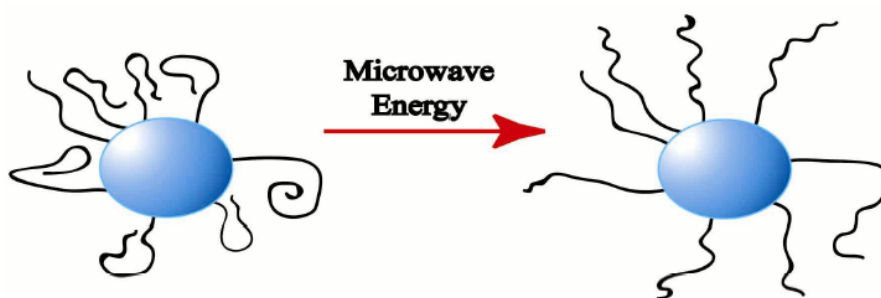
Le proprietà fisico-chimiche, la purezza dei composti finali sono state assegnate mediante TLC, FAB-MS, RP-HPLC analitico e  $^1\text{H}$  NMR.

## **4.SINTESI PEPTIDICA**

## **4.1 SINTESI PEPTIDICA IN FASE SOLIDA**

Sin dalla sua invenzione nel 1963 da parte di Bruce Merrifield,<sup>76</sup> la sintesi peptidica in fase solida (*Solid Phase Peptide Synthesis*, **SPPS**) è diventata lo standard per la sintesi di peptidi, migliorando notevolmente le rese di reazione e facilitando la purificazione dei prodotti finali rispetto alle tecniche precedenti in soluzione. Comunque la SPPS presenta ancora difficoltà dovute a fenomeni di aggregazione intra- ed inter-molecolari, formazione di foglietti  $\beta$ , ingombro sterico, e peptidi con sequenza incompleta. I tempi standard dei cicli di accoppiamento e deprotezione vanno dai 30 minuti alle 3 ore e spesso vanno ripetuti più di una volta a causa di reazione incomplete. Tradizionalmente la sintesi in fase solida viene effettuata a temperatura ambiente sotto flusso di azoto e richiede, quindi, tempi lunghi.<sup>77</sup>

Come abbiamo visto precedentemente, la sintesi assistita da microonde è, ormai, diventata una tecnica ampiamente accettata per aumentare le rese nella sintesi organica, grazie al rapido riscaldamento di molecole aventi un momento dipolare non nullo. Per questo motivo, negli ultimi anni si sta cercando, con successo, di applicare la tecnica delle microonde alla SPPS. In questo modo i classici problemi della sintesi in condizione standard, come fenomeni di aggregazione, formazione di foglietti  $\beta$ , ingombro sterico possono essere superati con l'energia delle microonde, permettendo un aumento della flessibilità delle catene peptidiche sulle resine.<sup>78</sup>



**Figura 28** Influenza delle microonde sulle catene peptidiche ancorate sulla resina

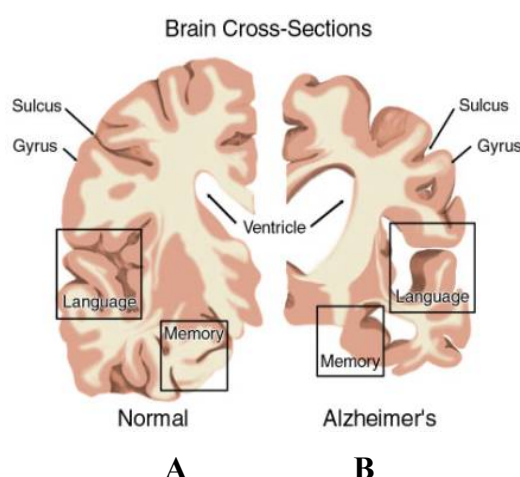
La combinazione delle microonde con la SPPS, permette quindi cicli di reazione più brevi, dell'ordine di pochi minuti, fornendo prodotti più puri, inoltre sono molti gli esempi noti in

letteratura che descrivono sintesi di peptidi più o meno lunghi contenenti anche particolari sequenze difficili con l'ausilio delle microonde. Le “sequenze difficili” sono proprio alcune particolari successioni aminoacidiche che portano alla formazione di associazioni intercatena all'interno della resina, con conseguente difficoltà per la sintesi classica, probabilmente a causa di un'incompleta solvatazione del complesso peptide-resina.

Nel mio ultimo anno di dottorato mi sono interessato soprattutto dell'ottimizzazione del nostro strumento a microonde per la sintesi peptidica, in particolar modo per la sintesi di un peptide particolarmente difficile, il  $\beta$ -amiloide, noto peptide probabilmente coinvolto nella patogenesi del morbo di Alzheimer.

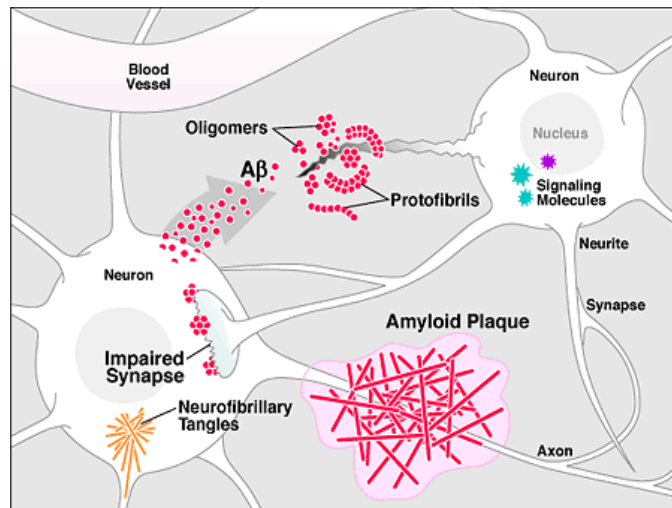
## **4.2 MORBO DI ALZHEIMER E PEPTIDE $\beta$ -AMILOIDE**

Il morbo di Alzheimer rientra nella classificazione delle malattie neurodegenerative caratterizzate da un processo cronico di morte neuronale con decorso inesorabilmente progressivo e tipiche dell'età adulta. Nonostante i rilevanti progressi compiuti negli ultimi anni dalla ricerca farmacologica, non esiste ancora nessun intervento terapeutico che si sia dimostrato in grado di far regredire o di arrestare, il processo patologico alla base di tali disturbi. Questa situazione dipende in gran parte dal fatto che i meccanismi cellulari e molecolari che sono alla base del danno neuronale osservati nelle diverse malattie neurodegenerative restano in buona parte sconosciuti. Nel morbo di Alzheimer il quadro anatomo-patologico è caratterizzato da due tipi di alterazioni, prevalenti a livello dell'ippocampo e delle aree associative della neocorteccia.<sup>79-80</sup>



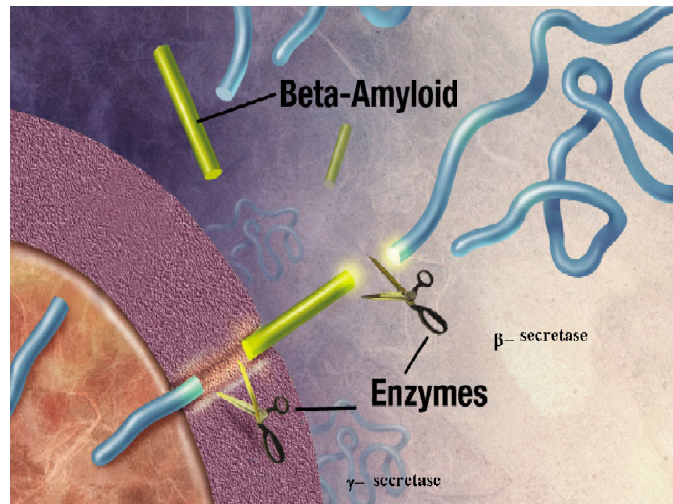
**Figura 29.** Sezioni di cervello di un paziente in condizioni fisiologiche (A) e affetto dalla Malattia di Alzheimer (B)

Si evidenziano sia accumuli intracellulari di materiale fibrillare costituito da filamenti elicoidali appaiati formati da una proteina normalmente associata alla tubulina, nota come proteina tau, in una forma patologica iperfosforilata. In più, in sede extracellulare, sono presenti agglomerati fibrillari di varie dimensioni, costituiti prevalentemente da un peptide, denominato  $\beta$ -amiloide, caratterizzati da insolubilità e inattaccabilità da parte delle proteasi (Figura 30).



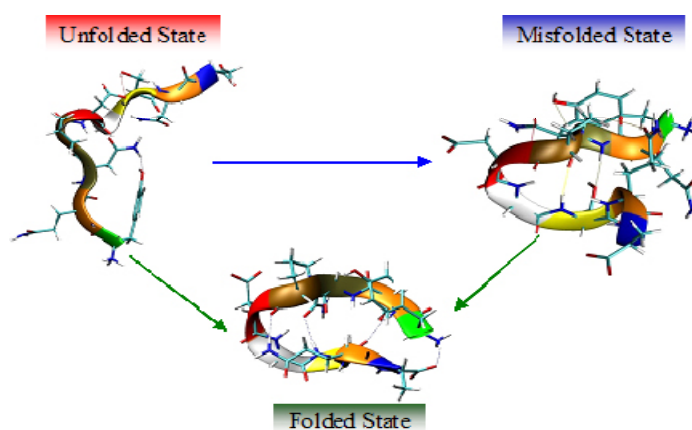
**Figura 30.** Neurone in presenza di neurofibrille e placche amiloidi.

Il peptide  $\beta$ -amiloide,  $A\beta$  [1-42] è costituito da una sequenza di 39-42 residui amminoacidi, scarsamente solubile in soluzioni acquose e con un'elevata tendenza ad aggregarsi anche in vitro. E' un peptide altamente idrofobico, con i residui idrofobici localizzati in corrispondenza della parte C-terminale (aminoacidi 29-39/29-42) e ragionevolmente responsabili della sua forte tendenza a formare aggregati e materiale insolubile in ambiente acquoso.<sup>81-82</sup> Il  $A\beta$  [1-42] deriva dall'anomala proteolisi di un normale precursore proteico, la proteina APP (Amiloid Protein Precursor). Quest'ultima è una proteina integrale di membrana, che assolve a varie funzioni, quali adesione, controllo dell'attività proteolitica e integrità dei canali ionici. La normale proteolisi della proteina APP ad opera dell'enzima  $\alpha$ -secretasi inizia col taglio a livello del residuo 687 che quindi distrugge la sequenza del peptide; mentre altri due enzimi la  $\beta$ -secretasi e la  $\gamma$ -secretasi operano invece un taglio in corrispondenza dei due estremi del peptide (residui 670-671 e 712-717 rispettivamente) permettendo così la liberazione del peptide integro, che di per sé assume la configurazione  $\beta$ -fibrillare amiloidogenica. Alterazioni a carico del gene APP costituiscono una delle possibili cause per l'insorgenza di questa patologia. Tali mutazioni interessano i siti di taglio delle tre secretasi, e possono comportare o l'inibizione dell'attività della  $\alpha$ -secretasi o favorire quella della  $\beta$  e della  $\gamma$ -secretasi, portando alla liberazione del peptide amiloideogenico che risulta essere neurotossico (Figura31).



**Figura 31.** Azione della  $\beta$  e  $\gamma$  secretasi.

E' stato proposto che  $A\beta$  esista in una conformazione  $\alpha$ -elicaoidale quando è parte integrante dell'APP (amiloide precursor peptide) transmembranario, con un notevole carattere amfipatico distribuito lungo tutta la sequenza: l'estremità idrofila N-terminale dell' $A\beta$  è esposta ad un ambiente acquoso, mentre l'estremità C-terminale fortemente idrofobica è inserita nei lipidi di membrana. In particolare, l'ipotesi corrente per spiegare l'aggregazione si basa su una transizione strutturale della catena polipeptidica di  $A\beta$ , la quale passa da un ripiegamento nativo  $\alpha$ -elica solubile ad una conformazione aberrante  $\beta$ -sheet, ed in tale conformazione, che si ritiene essere quella tossica, dà luogo alla formazione di fibrille insolubili.<sup>84</sup>



**Figura 32** Passaggio dalla conformazione  $\alpha$ -elica solubile ad una conformazione aberrante  $\beta$ -sheet,



Principale conseguenza della malattia è la diminuzione nel cervello della quantità di acetilcolina (fino al 90%), neurotrasmettitore fondamentale per le capacità intellettive, da qui derivano i principali effetti sintomatici tipici della malattia: la perdita della memoria a breve termine e le difficoltà di apprendimento. Sulla base di questa evidenza una delle possibilità per la regressione sintomatica della patologia consiste nell'incrementare il tono colinergico, principalmente attraverso l'utilizzo di inibitori dell'acetilcolinesterasi (Ach-esterasi)<sup>85</sup>. Gli inibitori dell'acetilcolinesterasi attualmente approvati per il trattamento del morbo di Alzheimer sono il Donezepil, la Rivastigmina, la Galantamina e la Tacrina.

Recenti studi attribuiscono agli elevati livelli plasmatici di colesterolo un importante fattore di rischio per l'AD. Nello studio del metabolismo della  $\beta$ -amiloide sono inoltre implicati i recettori di certe proteine (apo E) che fungono da trasportatori di colesterolo. È possibile che le statine possano diventare uno strumento farmacologico per la prevenzione e la terapia dell'AD. Un modesto effetto, inoltre, è stato dimostrato dall'utilizzo della vitamina E, antiossidante raccomandato dalle linee guida per la terapia della malattia, anche se però potrebbe essere più efficace come uno dei trattamenti in profilassi. Un diverso approccio terapeutico è quello rivolto a contrastare la formazione degli aggregati neurofibrillari  $\beta$ -amiloidi. Responsabile dell'aggregazione dei peptidi, con conseguente formazione della placca  $\beta$ -amiloide è la transizione conformazionale da peptidi a struttura random-coil o  $\alpha$  elica a oligomeri caratterizzati da una struttura secondaria  $\beta$ -sheet. Negli ultimi decenni, è stato ampiamente riconosciuto che molte sostanze, sia di sintesi che naturali, sono capaci di interagire con i peptidi A $\beta$  interferendo sulla transizione  $\alpha$ -elica/ $\beta$ -sheet.

Tra queste molecole rivestono una particolare importanza quattro classi di composti:

- 1) Peptidi  $\beta$ -breaker in grado di interferire con la formazione di fibrille.
- 2) Il colesterolo come componente dei "lipid raft" in grado di modulare il "folding" del peptide amiloide e di conseguenza il processo di aggregazione.
- 3) Alcuni composti naturali, che hanno dimostrato di possedere attività protettiva nei confronti della tossicità dell'amiloide, come per esempio diversi derivati triterpenici e fenolici, in particolare derivati dell'acido asiatico, alcune catechine, il resveratrolo.

4) Alcuni composti naturali come il congo red, la nicotina, la rifampicina e derivati semisintetici, che risultano in grado di inibire la formazione dell'amiloide insolubile interagendo con il frammento A $\beta$ (1-42).<sup>86</sup>

Il nostro gruppo di ricerca ha intrapreso un programma di ricerca volto alla sintesi di *small molecules* che potessero interagire con il peptide  $\beta$ -amiloide, con potenziale attività disaggregante e/o anti-aggregante. Da ciò si evince l'importanza di poter disporre del peptide in modo veloce e "su richiesta" dal momento che il peptide risulta notevolmente instabile e tende ad aggregarsi spontaneamente, quindi non adatto per essere conservato per troppo tempo.

Sebbene siano state ottimizzate alcune metodologie sintetiche per l'ottenimento del peptide  $\beta$ -amiloide, l'A $\beta$  [1-42] risulta ancora problematico da sintetizzare. La sua composizione altamente idrofobica determina l'aggregazione delle catene peptidiche crescenti sulla resina. Questa aggregazione del peptide sulla resina può risultare dalla scarsa solvatazione e dall'ingombro sterico della porzione N-terminale che porta ad incompleti step di accoppiamento e deprotezione.

Questo è un problema serio nella sintesi in fase solida in quanto sequenze incomplete di varia lunghezza accumulate durante la sintesi sono spesso difficili da separare dal peptide target dal momento che questi analoghi più piccoli presentano solitamente grosse analogie con il peptide desiderato. Una diminuzione della purezza del peptide grezzo e la scarsa solubilità dell'A $\beta$  [1-42] portano, spesso, a conseguenti difficoltà nella purificazione.

Per questi motivi abbiamo deciso di applicare la tecnica delle microonde alla sintesi in fase solida del peptide  $\beta$ -amiloide. In questo modo i classici problemi della sintesi in condizione standard, come fenomeni di aggregazione, formazione di foglietti  $\beta$ , ingombro sterico possono essere in parte superati, in quanto l'energia delle microonde permette solitamente una maggior distensione della catena peptidica nascente sulla resina.

## 4.2 CHIMICA

Dato che il nostro strumento a microonde per motivi tecnici non risulta adatto per la sintesi in fase solida step by step, in quanto manca di opportuni sistemi di bublaggio di gas inerti e di sistemi di lavaggio della resina dopo ogni step di coupling e di deprotezione, abbiamo preferito effettuare la sintesi del peptide in fase solida convergente.<sup>87-88</sup> In particolare sono stati sintetizzati quattro frammenti di lunghezza paragonabile del peptide A $\beta$  [1-42], (Figura) secondo la metodica classica in fase solida a temperatura ambiente, mentre il successivo coupling dei diversi frammenti è stato effettuato mediante l'ausilio delle microonde.

Sequenza del  $\beta$ -amiloide [1-42]:

<sup>1</sup>DAEFRHDSG<sup>10</sup>YEVHHQKLVF<sup>20</sup>FAEDVGSNKG<sup>30</sup>AIIGLMVGGVVI<sup>42</sup>A

Frammento A: <sup>30</sup>AIIGLMVGGVVI<sup>42</sup>A-OH

Resina utilizzata Wang

Frammento B: Fmoc-<sup>20</sup>FAEDVGSNK<sup>29</sup>G-OH

Resina utilizzata Sasrin

Frammento C: Fmoc-<sup>10</sup>YEVHHQKLV<sup>19</sup>F-OH

Resina utilizzata Sasrin

Frammento D: Fmoc-<sup>1</sup>DAEFRHDS<sup>9</sup>G-OH

Resina utilizzata Sasrin

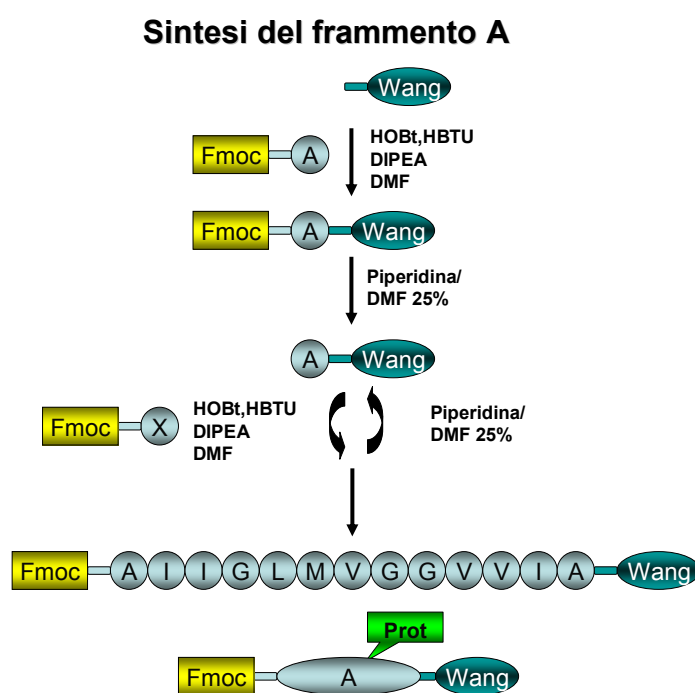
Gli aminoacidi scelti per la sintesi dei frammenti presentano il gruppo protettore Fmoc sull' $N^\alpha$ , mentre in catena laterale la protezione ortogonale scelta è di natura tert-butilica.

Il peptide A è stato assemblati su supporto solido usando la classica procedura peptidica, a temperatura ambiente, *via-Fmoc* (N-Fluorenilmetossi- carbonile) utilizzando una resina Wang.

Dopo aver fatto rigonfiare la resina in DMF, l'accoppiamento del primo amminoacido è stato effettuato usando un eccesso di amminoacido pari a 3 volte il grado di sostituzione della resina in presenza degli agenti di *coupling* HBTU/HOBt e di DIEA.

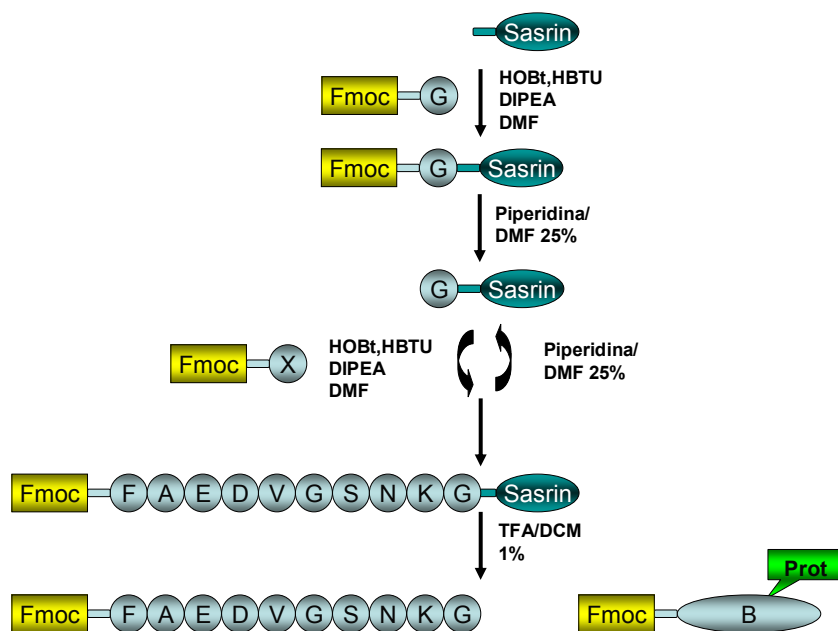
Il gruppo  $N^{\alpha}$ -Fmoc è stato rimosso mediante trattamento del peptide legato alla resina con una soluzione al 25% di piperidina in DMF. Il procedimento è stato condotto fino alla completezza della sintesi.

Le sequenze amminoacidiche sono state così assemblate alternando cicli di deprotezione e cicli di accoppiamento, fino all'ottenimento del frammento A completo, ancorato sulla resina Wang e con tutti i gruppi protettori nelle catene laterali amminoacidiche.



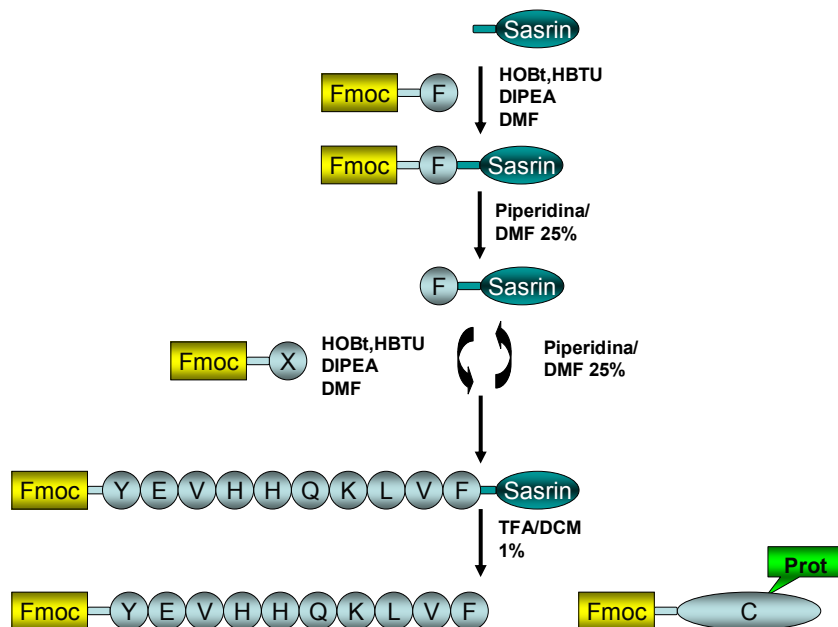
Allo stesso modo sono stati sintetizzati gli altri tre frammenti B, C e D ma utilizzando la resina Sasrin, in quanto essendo super acido sensibile, ha permesso il cleavage dalla resina con una miscela TFA 1%/DCM senza la contemporanea rimozione dei gruppi protettori in catena laterale.

### Sintesi del frammento B



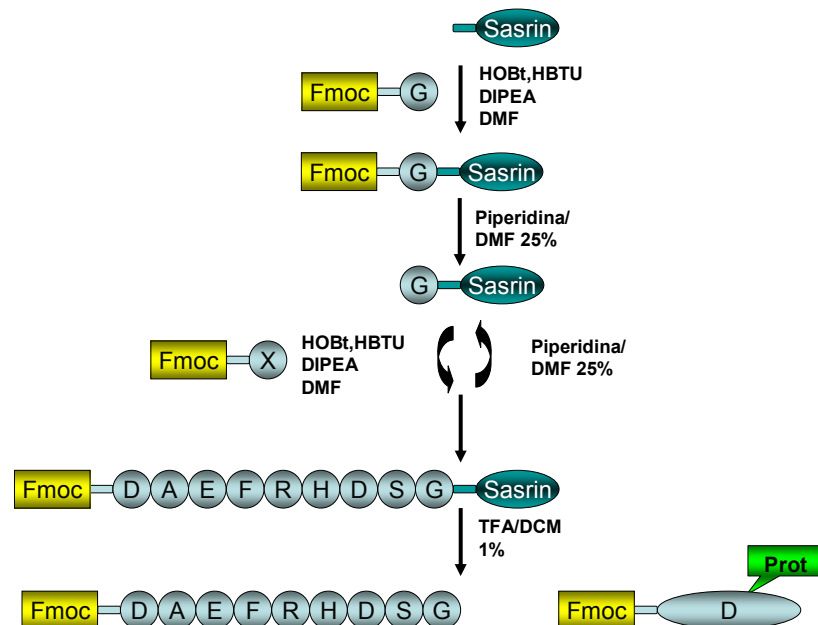
Schema 27

### Sintesi del frammento C



Schema 28

### Sintesi del frammento D



Schema 29

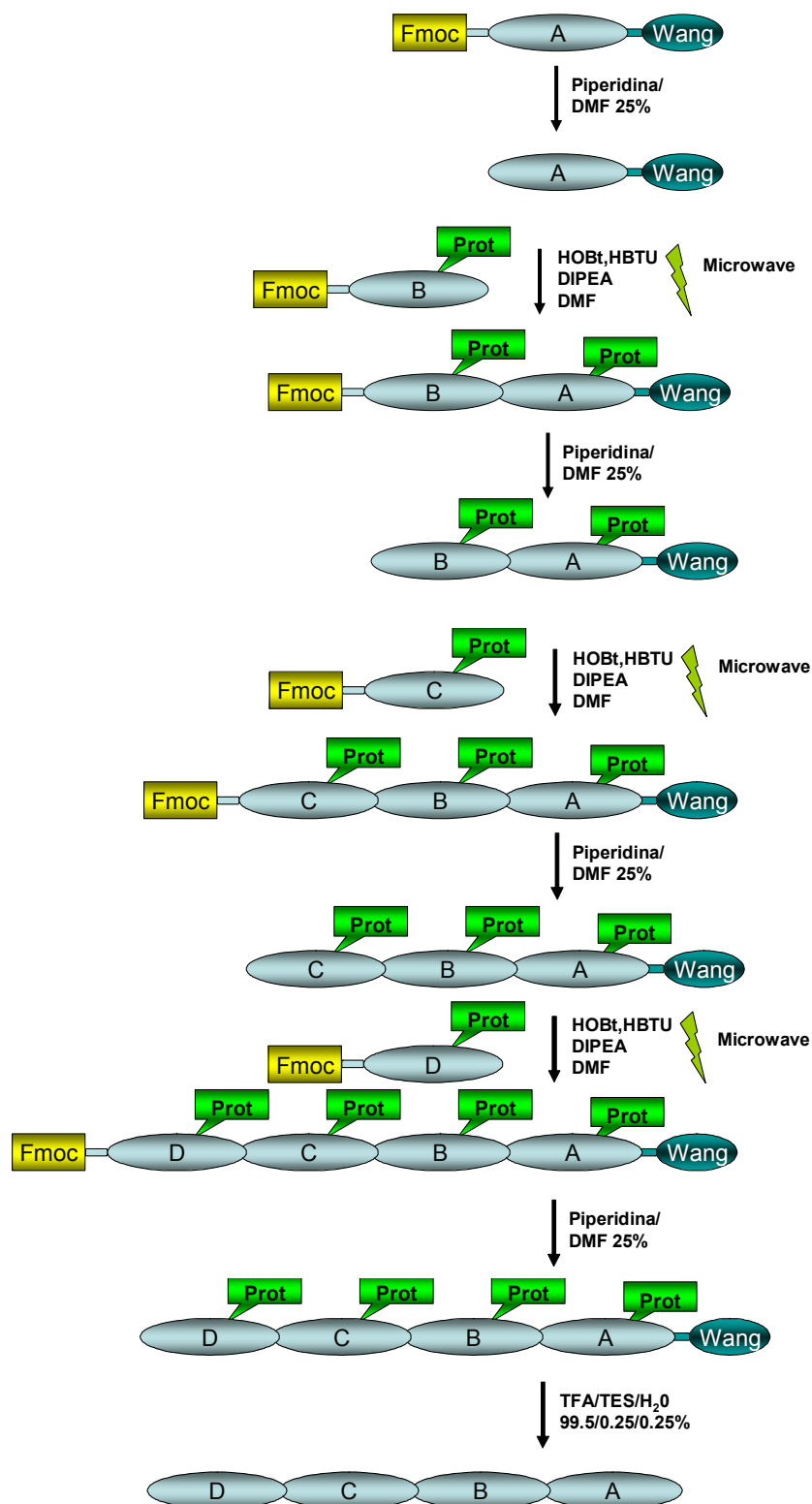
Una volta sintetizzati i quattro frammenti, l'accoppiamento mediante microonde è stato effettuato secondo lo schema 30 illustrato.

L'accoppiamento tra i frammenti A e Fmoc-B è stato effettuato utilizzando agenti di *coupling* HBTU/HOBt (3 eq.) e di DIEA (6eq.) con irradiazione di microonde per circa un'ora.

Il gruppo  $N^{\alpha}$ -Fmoc è stato rimosso mediante trattamento del peptide legato alla resina con una soluzione al 25% di piperidina in DMF. Allo stesso modo sono stati effettuati i *coupling* degli altri frammenti C e D, fino all'ottenimento del peptide A $\beta$  [1-42].

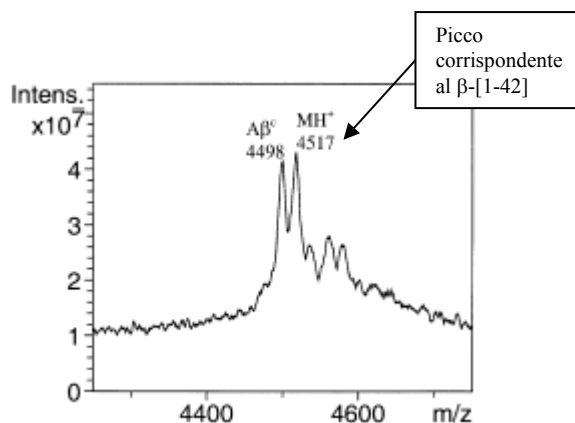
Successivamente il *cleavage* dalla resina viene effettuato con una miscela TFA/H<sub>2</sub>O/TES (99.5/0.5/0.5%) per 3 ore a temperatura ambiente. Dopo filtrazione della resina, il solvente viene concentrato sotto pressione ed il peptide è stato precipitato con etere etilico.

## Sintesi del $\beta$ -amiloide [1-42]



Schema 30

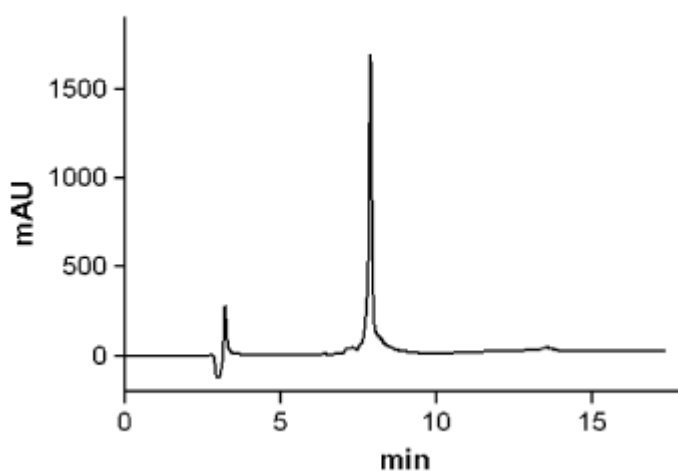
Il grezzo di reazione è stato successivamente analizzato mediante MALDI-TOF, dimostrando la presenza del peptide  $\beta$ -amiloide [1-42], (figura) anche se le rese sono state piuttosto scarse, con alcuni sottoprodotti di reazione.



**Figura 33** Analisi MALDI-TOF del grezzo di reazione

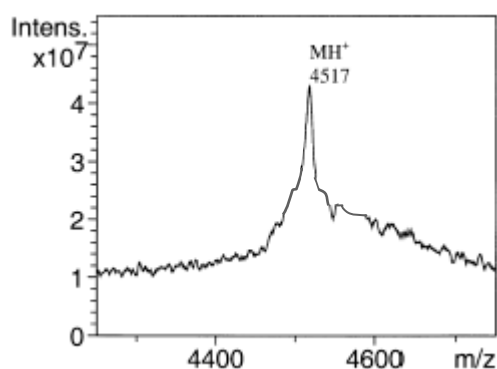
Il grezzo di reazione è stato purificato, mediante HPLC a fase inversa con colonna C-4, usando come eluente una soluzione a gradiente lineare di  $\text{H}_2\text{O}$  ed acetonitrile con l'1% di TFA, fornendo il peptide desiderato con rese finali circa del 30%.

Infine il peptide  $\text{A}\beta$  [1-42] è stato caratterizzato mediante RP-HPLC analitico con colonna C-4 ed analisi MALDI-TOF. Figura



**Figure 34** Cromatogramma di RP-HPLC analitico del peptide  $\text{A}\beta$ [1-42]





**Figura 35** Analisi MALDI-TOF del peptide A $\beta$ [1-42] purificato

Il coupling dei quattro frammenti è stato condotto anche in condizioni standard a temperatura ambiente, in modo da poter validare il metodo, ed infatti in questo caso non siamo riusciti a sintetizzare il nostro peptide in quanto il fenomeno dell'aggregazione è stato talmente rapido da impedire sia il coupling che la successiva purificazione.

I risultati, ottenuti con il riscaldamento mediante microonde, sono stati incoraggianti ma ancora non del tutto ottimali, con rese inferiori da altri metodi descritti in letteratura, questo probabilmente è dovuto alla inadeguatezza del nostro strumento per le microonde per la sintesi in fase solida, in quanto manca di un'efficiente sistema di bublaggio dell'azoto e di lavaggio della resina dopo ogni step di coupling. Comunque l'approccio sintetico è risultato valido dal momento che, rispetto alla sintesi standard a temperatura ambiente, siamo riusciti comunque ad isolare il nostro peptide, inoltre al momento stiamo cercando di adattare in modo ottimale il nostro apparecchio, con opportune integrazioni al fine di evitare i problemi descritti.

## **5.CONCLUSIONI**

I grossi vantaggi dell'utilizzo delle microonde nella sintesi organica stanno rendendo, ormai, questa metodica di uso standard nella pratica di laboratorio. Fino a qualche anno fa, le microonde erano spesso utilizzate solo quando le altre possibilità per effettuare una particolare reazione erano risultate vane o quando erano richiesti tempi particolarmente lunghi o temperature molto alte. Questo modo di pensare sta ora lentamente cambiando e, grazie anche ad una maggiore disponibilità di reattori per le microonde in molti laboratori, si sta diffondendo rapidamente l'utilizzo di queste radiazioni anche per le reazioni "classiche". I vantaggi del riscaldamento con l'ausilio delle microonde sono molteplici:

- in primo luogo, la notevole riduzione dei tempi di reazione, le rese aumentate e spesso anche la formazione di prodotti più puliti
- la possibilità di poter monitorare parametri come temperatura e pressione in modo accurato nei moderni reattori, portando quindi a condizioni di reazioni più riproducibili
- il riscaldamento è più efficace rispetto al classico bagnetto ad olio, grazie al gradiente di temperatura invertito nel mezzo di reazione
- la possibilità di poter lavorare in parallelo od in modo automatizzato sequenziale.

L'utilizzo delle microonde ha permesso al nostro gruppo di ricerca di poter sintetizzare velocemente numerosi composti dotati di attività citotossica contenenti il sistema 3-amino-3-etossicarbonil-2,3-diidrotieno[2,3-*b*]nafto-4,9-dione, DTNQ, fornendo una esauriente SAR sulle modifiche apportate sull'anello dichetopiperazinico coniugato. Diversi composti, come il derivato 7a (DTNQ-Pro) della prima serie ed i derivati che presentano una funzione amminica protonabile distanziata da una catena etilica, in particolare 25 e 28, mostrano un'attività citotossica simile o maggiore della doxorubicina sulle linee cellulari MCF-7 e SW-620. Inoltre questi derivati sono risultati attivi anche su diverse linee cellulari resistenti al trattamento con la doxorubicina, come le CaCo-2.

L'utilizzo delle microonde è risultato particolarmente vantaggioso per la sintesi di strutture peptidomimetiche, quali il lattame di Freidinger ed il legame aminometilenico, isostero del legame peptidico. La sintesi di queste strutture a partire da un nuovo unico building blocks, gli iododerivati di aminoacidi, ha quindi validato la loro efficacia nel generare una buona diversità molecolare. La nuova metodica descritta per il legame aminometilenico ha

permesso anche la sua introduzione su residui di Prolina, che, con la metodica classica, era quasi del tutto inevitabile la formazione di sottoprodotti di racemizzazione.

Infine abbiamo applicato le microonde per la sintesi del peptide  $\beta$ -amiloide. I buoni risultati finora ottenuti hanno dimostrato la validità del metodo ma anche la necessità di integrare il nostro apparecchio per le microonde con opportuni sistemi di bublaggio di gas inerti e di lavaggio delle resine in modo automatizzato, al fine di ottimizzare ulteriormente la sintesi in fase solida di peptidi caratterizzati da particolari sequenze difficili.

## **6.PARTE SPERIMENTALE**

Le strutture dei composti sintetizzati sono state confermate dalle loro proprietà analitiche e spettroscopiche. I controlli cromatografici sono stati eseguiti mediante cromatografia su strato sottile (TLC), l'analitica è stata effettuata su uno strato di 0.25 mm di gel di silice 60 PF254 Merck mentre la TLC preparativa è stata effettuata su lastre di vetro ricoperte con uno strato di 0.5 mm di gel di silice PF254 Merck. Per la cromatografia flash è stato usato gel di silice Merck 60 (300-400 mesh). I punti di fusione sono stati misurati con un apparecchio Kolfer e non sono corretti. Le rotazioni ottiche sono state determinate con un polarimetro Perkin-Elmer 241 MC. Gli spettri di massa ad impatto elettronico sono stati registrati a 70 eV con un spettrometro FAB. Gli spettri  $^1\text{H}$  NMR sono stati ottenuti con un spettrometro Bruker-500 operante a 500 MHz. I valori di chemical shifts sono riportati in  $\delta$  (ppm) utilizzando  $\text{Me}_4\text{Si}$  come riferimento interno ed i valori di  $J$  sono riportati in Hertz (Hz).

#### Abbreviazioni

Le abbreviazioni usate seguono le regole della IUPAC-IUB Commission of Biochemical Nomenclature in J. Biol. Chem. 247, (1972), 977-983, e sono le seguenti:

DBU: 1,8-diazabicyclo (5.4.0) undec-7-one, DMF: dimetilformamide, DCM: diclorometano, THF: tetraidrofurano, DIPEA: diisopropiletilamina, EtOAc: acetato di etile, HOBt: N-idrossibenzotriazolo, TFA: acido trifluoroacetico, HBTU: 2-(1H-benzotriazolo-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronioesafluoro fosfato, Fmoc: N-9-Fluorenylmethoxycarbonyl,  $^t\text{Bu}$ : tert-butile, Trt: tritile, Boc: tert-butoxycarbonile, FC: cromatografia flash, FAB-MS fast-atom bombardment mass spectrometry., TLC: Cromatografia su strato sottile.

#### SAGGI CITOTOSSICI

Le cellule sono inoculate in un volume di 100  $\mu\text{l}$  (1500 cellule) e sistemati in pozzetti multiwell 96. Le cellule vengono preincubate durante 24 ore previa addizione dei composti in atmosfera di  $\text{CO}_2$  al 5% e 95% d'aria a 37° C. Gli agenti citotossici sono aggiunti, sciolti in DMSO o acqua fino ad arrivare ad una concentrazione iniziale di  $10^{-5}$  M. In seguito ogni composto viene saggiato a diverse concentrazioni in modo da determinare i valori più corretti di  $\text{IC}_{50}$ . Dopo 4 giorni di incubazione a 37° C sotto atmosfera di  $\text{CO}_2$  al 5% e 95% d'aria, il numero di cellule vitali viene determinato tramite saggio colorimetrico con

sulforodamina (SBR), attraverso misura della densità ottica. I dati raccolti vengono espressi come  $\%T/C = \text{densità ottica delle cellule trattate} / \text{densità ottica del controllo} \times 100$ . I valori della citotossicità, espressa come  $IC_{50}$ , sono stimati a partire dalle curve dosi-risposte ottenute con i dati di tre saggi indipendenti e rappresentano la concentrazione minima di prodotto necessaria per ridurre la proliferazione delle cellule del 50%.

## PARTE SINTETICA

Tutti gli esperimenti di irradiazione mediante microonde sono stati effettuati in un Milestone CombiChem Microwave Synthesizer in un vessel di 4 mL. La rotazione del rotore, l'irradiazione, il tempo e la potenza sono stati monitorati con il pacchetto software "easywave". La temperatura è stata monitorata con l'aiuto di una fibra ottica inserita in uno dei contenitori delle reazioni. Una volta raggiunta la temperatura descritta nei vari esperimenti, la miscela di reazione viene mantenuta a questa temperatura per il tempo descritto e successivamente raffreddata rapidamente fino a temperatura ambiente.

*Metodo generale per la preparazione dei derivati spiro [(diidropirazin-2,5-dione)-6,3'-(2',3'-diidrotieno[2,3-b]nafto-4',9'-dione)] (4-6 e 8-14) e di spiro [(esaidropirrolo-2,5-dione)-6,3'-(2',3'-diidrotieno [2,3-b]nafto-4',9'-dione)] (7)*

Ad una soluzione di DTNQ (1-2 mmol) in diclorometano/DMF (20 ml/5ml), si aggiungono successivamente i corrispondenti N-Fmoc amino acidi, Gly, Ala, Leu, D-Pro, Phe, Tyr (<sup>t</sup>Bu), Ser(<sup>t</sup>Bu), Cys(Trt), Met, Lys(Boc), Hys(Trt), (1.1 eq), HBTU (1.2 eq), HOBt (1.2 eq) e DIEA (2.4 eq) e la miscela di reazione viene mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente durante 48 ore. Successivamente, il solvente viene evaporato e il grezzo di reazione diluito con diclorometano (20 ml), e la soluzione risultante è lavata con una soluzione di acido citrico al 10% (2x25 ml), con una soluzione al 10% di bicarbonato sodico (2x25 ml), con acqua (2x25 ml) e successivamente anidrificata su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Successivamente i residui sono disciolti in diclorometano (5 ml), si aggiunge una soluzione al 20% di piperidina in DMF (5-10 ml) e la reazione si mantiene sotto agitazione a temperatura ambiente durante 30 minuti e a temperatura di reflusso durante 2 ore.. Dopo

evaporazione del solvente i prodotti sono stati purificati per cromatografia su gel di silice usando differenti sistemi di solventi come eluente

*Metodo generale per la rimozione dei gruppi protettori delle catene laterali.*

La soluzione di derivati protetti in catena laterale (9'-11' e 13'-14'; 0.03-0.05 mM) in diclorometano (10 ml) è trattata con acido trifluoroacetico (2 ml) e tenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 1-3 ore. Dopo evaporazione del solvente, i residui sono trattati con diclorometano ed etere di etilico, con la formazione dei corrispondenti composti finali 9-11 e 13-14. La purificazione di tutti questi composti è ottenuta tramite cromatografia su gel di silice.

Secondo queste metodiche, sono stati sintetizzati i seguenti derivati:

**Spiro[(diidropirazin-2,5-dione)-6,3'-(2',3'-diidrotieno[2,3-*b*] nafto-4',9'-dione)] (4).** FC in 10% MeOH in Cl<sub>3</sub>CH. Solido giallo (35%), pf 197-201°C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ, 3.53-3.56 (d, 1H, *J*<sub>2',2''</sub> = 12.9 Hz); 4.05-4.08 (d, 1H); 4.20-4.23 (d, 1H); 4.26-4.29 (d, 1H); 7.69-7.76 (m, 2H); 8.02-8.04 (d, 1H); 8.06-8.08 (d, 1H). FAB-MS *m/z* calcolato per C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>S 314.3, trovato 314.1

**(3S,3'R)-3-Metilspiro[(diidropirazin-2,5-dione)-6,3'-(2',3'-diidrotieno[2,3-*b*]nafto-4',9'-dione)] (5a).** FC in 20% MeOH in Cl<sub>3</sub>CH. Solido giallo, due isomeri (39%) pf 205-206°C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ, 1.69 (s, s 6H); 3.51-3.54 (d, 1H, *J*<sub>2',2''</sub> = 12.9 Hz); 3.55-3.58 (d, 1H, *J*<sub>2',2''</sub> = 12.7 Hz); 4.08-4.11 (d, 1H); 4.19-4.22 (d, 1H); 4.28 (m, 1H); 4.39 (m, 1H); 7.76-7.83 (m, 4H); 8.04-8.06 (d, 2H); 8.08-8.10 (d, 1H). FAB-MS *m/z* calcolato per C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>S 328.3, trovato 328.9.

**(3S,3'S)-3-Metilspiro[(diidropirazin-2,5-dione)-6,3'-(2',3'-diidrotieno[2,3-*b*]nafto-4',9'-dione)] (5b).** FC in 20% MeOH in Cl<sub>3</sub>CH. Solido giallo, due isomeri (39%) pf 210-211°C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ, 1.22 (s, s 6H); 3.51-3.54 (d, 1H, *J*<sub>2',2''</sub> = 12.9 Hz); 3.55-3.58 (d, 1H, *J*<sub>2',2''</sub> = 12.7 Hz); 4.08-4.11 (d, 1H); 4.19-4.22 (d, 1H); 4.28 (m, 1H); 4.39 (m, 1H); 7.76-7.83 (m, 4H); 8.04-8.06 (d, 2H); 8.08-8.10 (d, 1H). FAB-MS *m/z* calcolato per C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>S 328.3, trovato 328.9.



**(3*S*,3'*R*)-3-sec-butylspiro [(diidropirazina-2,5-dione) -6,3'-(2',3'-diidrotieno [2,3-*b*] nafto-4',9'-dione)] (6a).** FC in AcOEt. Solido giallo (27%), pf 223-224°C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.26 (s, 6H), 1.69-1.75 (m, 1H), 1.79-1.82 (m, 1H), 1.89-1.93 (m, 1H), 3.34 (d, 1H, *J* = 12.9 Hz, H-2'*b*), 4.37 (d, 1H, H-2'*a*), 4.46-4.49 (m, 1H, H-3), 6.32 (s, 1H, NH), 6.70 (s, 1H, NH), 7.67-7.73 (m, 2H, H-6' e H-7'), 8.05 (d, 1H, *J*). FAB-MS *m/z* calcolato per C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S 370.42, trovato 370.63.

**(3*S*,3'*S*)-3-sec-butylspiro[(diidropirazina-2,5-dione)-6,3'-(2',3'-diidrotieno [2,3-*b*] nafto-4',9'-dione)] (6b):** FC in AcOEt; solido giallo (23%); pf 226-228 °C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.26 (s, 6H), 1.87-1.94 (m, 1H), 1.95-2.05 (m, 1H), 2.17-2.21 (m, 1H), 3.38 (d, 1H, *J* = 12.9 Hz, H-2'*b*), 4.14-4.16 (m, 1H, H-3), 4.25 (d, 1H, H-2'*a*), 6.26 (s, 1H, NH), 6.58 (s, 1H, NH), 7.68-7.75 (m, 2H, H-6' e H-7'), 8.03 (d, 1H, *J*). FAB-MS *m/z* calcolato per C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S 370.42, trovato 370.61.

**3(*S*),6(*R*)-Spiro[(essaidropirrolo[1,2-*a*]pirazina-1,4-dione) -6,3'-(2',3'-diidrotieno[2,3-*b*]nafto-4',9'-dione)] (7a).** FC in AcOEt. Solido giallo (20%), pf 199-203°C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Cl<sub>3</sub>CD): δ, 1.99- 2.15(m, 3H); 2.47-2.51 (m, 1H); 3.26-3.29 (d, 1H, *J*<sub>2',2''</sub> = 12.6 Hz); 3.69-3.73 (m, 2H); 4.59-4.62 (d, 1H); 4.64-4.66 (m, 1H); 6.69 (s, 1H); 7.69-7.75 (m, 2H); 7.98-8.00 (d, 1H); 8.05-8.07 (d, 1H). FAB-MS *m/z* calcolato per C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S 354.4 trovato 355.0

**3(*S*),6(*S*)-Spiro[(essaidropirrolo[1,2-*a*]pirazina-1,4-dione) -6,3'-(2',3'-diidrotieno[2,3-*b*]nafto-4',9'-dione)] (7b).** FC in AcOEt. Solido giallo (18%), pf 279-283°C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ, 1.80-1.84 (m, 1H); 1.92-2.06 (m, 2H); 2.33-2.36 (m, 1H); 3.31-3.34 (d, 1H, *J*<sub>2',2''</sub> = 12.6 MHz); 3.49-3.51 (m, 1H); 3.84-3.86 (m, 1H); 4.10-4.13 (d, 1H); 4.14-4.16 (m, 1H). FAB-MS *m/z* calcolato per C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S 354.4 trovato 354.6

**(3*S*,3'*R*)-3-benzilspiro[(diidropirazina-2,5-dione)-6,3'-(2',3'-diidrotieno[2,3-*b*]nafto-4',9' -dione)] (8a):** FC in 5% MeOH in CHCl<sub>3</sub>; solido giallo (20%); fp 249-251 °C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3.10-3.14 (m, 2H), 3.61 (d, 1H, *J* = 12.6 Hz, H-2'*b*), 3.83 (d, 1H, H-2'*a*), 4.38-4.40 (m, 1H, H-3), 7.24-7.31 (m, 5H, aryl), 7.83-7.85 (m, 2H, H-6' e H-7').

7'), 7.92 (d, 1H,  $J=7.5$  Hz, H-8'), 7.98 (d, 1H,  $J=7.4$  Hz, H-5'), 8.71 (s, 1H, NH), 8.83 (s, 1H, NH);  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{Cl}_3\text{CD}$ ):  $\delta$  2.60 (d, 1H,  $J=12.9$  Hz, H-2'b), 3.11-3.15 (m, 1H), 3.33-3.36 (m, 1H), 3.97 (d, 1H, H-2'a), 4.66-4.71 (m, 1H, H-3), 6.33 (s, 1H, NH), 6.57 (s, 1H, NH), 7.29-7.38 (m, 5H, aryl), 7.68-7.74 (m, 2H, H-6' e H-7'), 7.98 (d, 1H,  $J=7.3$  Hz, H-8'), 8.06 (d, 1H,  $J=7.4$  Hz, H-5'); FAB-MS  $m/z$  calcolato per  $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$  404.44, trovato 404.63.

**(3*S*,3'*S*)-3-benzilspiro[(diidropirazina-2,5-dione)-6,3'-(2',3'-diidrotieno[2,3-*b*]nafto-4',9'-dione)] (8b):** FC in 5% MeOH in  $\text{CHCl}_3$ ; solido giallo (26%); fp 263-265 °C;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  3.08-3.12 (m, 2H), 3.62 (d, 1H,  $J=12.6$  Hz, H-2'b), 3.87 (d, 1H, H-2'a), 4.40-4.42 (m, 1H, H-3), 7.22-7.30 (m, 5H, aryl), 7.83-7.85 (m, 2H, H-6' e H-7'), 8.01 (d, 1H,  $J=7.5$  Hz, H-8'), 8.03 (d, 1H,  $J=7.4$  Hz, H-5'), 8.38 (s, 1H, NH), 8.80 (s, 1H, NH);  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.38 (d, 1H,  $J=12.9$  Hz, H-2'b), 3.45-3.47 (m, 1H), 3.51-3.53 (m, 1H), 4.21-4.23 (m, 1H, H-3), 4.26 (d, 1H, H-2'a), 6.18 (s, 1H, NH), 6.30 (s, 1H, NH), 7.29-7.38 (m, 5H, aryl), 7.68-7.78 (m, 2H, H-6' e H-7'), 8.05 (d, 1H,  $J=7.4$  Hz, H-8'), 8.11 (d, 1H,  $J=7.4$  Hz, H-5'); FAB-MS  $m/z$  calcolato per  $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$  404.44, trovato 404.51.

**(3*S*,3'*R*)-3-[4-(*tert*-butilossi) benzil] spiro[(diidropirazina-2,5-dione)-6,3'-(2',3'-diidrotieno[2,3-*b*]nafto-4',9'-dione)] (9'a):** FC in AcOEt; resa 24%;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.32 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 2.68 (d, 1H,  $J=12.9$  Hz, H-2'b), 3.11-3.15 (m, 1H), 3.28-3.32 (m, 1H), 4.05 (d, 1H, H-2'a), 4.66-4.71 (m, 1H, H-3), 6.07 (s, 1H, NH), 6.24 (s, 1H, NH), 7.00 (d, 2H,  $J=6.8$  Hz, aryl), 7.19 (d, 2H,  $J=6.9$  Hz, aryl), 7.70-7.74 (m, 2H, H-6' e H-7'), 8.00 (d, 1H,  $J=7.4$  Hz, H-8'), 8.06 (d, 1H,  $J=7.5$  Hz, H-5'). Dopo la rimozione del gruppo *tert*butil il corrispondente (3*S*,3'*R*)-3-(4-idrossibenzil)spiro-[(diidropirazina-2,5-dione)-6,3'-(2',3'-diidrotieno[2,3-*b*]nafto-4',9'-dione)] (**9a**) è ottenuto come un solido giallo: fp 282-283 °C;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  2.72-2.74 (m, 1H), 3.03-3.05 (m, 1H), 3.73 (d, 1H,  $J=12.6$  Hz, H-2'b), 3.82 (d, 1H, H-2'a), 4.38-4.40 (m, 1H, H-3), 6.95 (d, 2H,  $J=7.4$  Hz, aryl), 7.12 (d, 2H,  $J=7.4$  Hz, aryl), 7.804-7.87 (m, 2H, H-6' e H-7'), 7.97 (d, 1H,  $J=7.5$  Hz, H-8'), 8.01 (d, 1H,  $J=7.4$  Hz, H-5'), 8.72 (s, 1H, NH), 8.79 (s, 1H, NH);  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2.68 (d, 1H,  $J=12.9$  Hz, H-2'b), 3.11-3.15 (m, 1H),

3.28-3.32 (m, 1H), 4.03 (d, 1H, H-2'a), 4.66-4.69 (m, 1H, H-3), 6.07 (s, 1H, NH), 6.24 (s, 1H, NH), 7.00 (d, 2H,  $J = 6.9$  Hz, aryl), 7.19 (d, 2H,  $J = 6.9$  Hz, aryl), 7.70-7.74 (m, 2H, H-6' e H-7'), 8.00 (d, 1H,  $J = 7.4$  Hz, H-8'), 8.08 (d, 1H,  $J = 7.4$  Hz, H-5'); FAB-MS  $m/z$  calcolato per C<sub>22</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S 420.44, trovato 420.41.

**(3*S*,3'*S*)-3-[4-(*tert*-butilossi)benzil]spiro[(diidropirazina-2,5-dione)-6,3'-(2',3'-diidrotieno[2,3-*b*]nafto-4',9'-dione)] (9'b):** FC in AcOEt; resa 32%; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1.32 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 3.40 (d, 1H,  $J$  12.8 Hz, H-2'b), 3.45-3.47 (m, 2H), 4.21-4.23 (m, 1H, H-3), 4.29 (d, 1H, H-2'a), 5.89 (s, 1H, NH), 6.51 (s, 1H, NH), 7.03 (d, 2H,  $J$  7.4 Hz, aryl), 7.33 (d, 2H,  $J$  7.4 Hz, aryl), 7.70-7.78 (m, 2H, H-6' e H-7'), 8.10-8.13 (m, 2H, H-8' and H-5'). Dopo la rimozione del gruppo *tert*butile il corrispondente (3*S*,3'*S*)-3-(4-idrossibenil)-spiro [(diidropirazina-2,5-dione)-6,3'-(2',3'-diidrotieno[2,3-*b*]nafto-4',9'-dione)] (**9b**) è ottenuto come solido giallo (91%): fp 293-294 °C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  3.04-3.06 (m, 1H), 3.08-3.10 (m, 1H), 3.69 (d, 1H,  $J$  12.6 Hz, H-2'b), 3.82 (d, 1H, H-2'a), 4.38-4.40 (m, 1H, H-3), 6.90 (d, 2H,  $J$  7.4 Hz, aryl), 7.23 (d, 2H,  $J$  7.4 Hz, aryl), 7.84-7.89 (m, 2H, H-6' e H-7'), 7.98 (d, 1H,  $J$  7.5 Hz, H-8'), 8.03 (d, 1H,  $J$  7.4 Hz, H-5'), 8.41 (s, 1H, NH), 8.79 (s, 1H, NH); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3.36 (d, 1H,  $J$  12.8 Hz, H-2'b), 3.40-3.44 (m, 2H), 4.19-4.21 (m, 1H, H-3), 4.27 (d, 1H, H-2'a), 6.00 (s, 1H, NH), 6.58 (s, 1H, NH), 7.03 (d, 2H,  $J$  7.4 Hz, aryl), 7.33 (d, 2H,  $J$  7.4 Hz, aryl), 7.70-7.78 (m, 2H, H-6' e H-7'), 8.00 (d, 1H,  $J$  7.4 Hz, H-8'), 8.03 (d, 1H,  $J$  7.4 Hz, H-5'); FAB-MS  $m/z$  calcolato per C<sub>22</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S 420.44, trovato 420.41.

**(3*S*,3'*R*)-3-[(*tert*-butilossi) metil] spiro [diidropirazina-2,5-dione-6,3'-(2',3'-diidrotieno [2,3-*b*]nafto-4',9'-dione)] (10'a):** FC in AcOEt; resa 26%; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.40 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 3.41 (d, 1H,  $J$  12.6 Hz, H-2'b), 3.69-3.72 (m, 1H), 3.82-3.84 (m, 1H), 4.35 (d, 1H, H-2'a), 4.58-4.60 (m, 1H, H-3), 6.57 (s, 1H, NH), 6.64 (s, 1H, NH), 7.69-7.75 (m, 2H, H-6' e H-7'), 8.00 (d, 1H,  $J = 7.3$  Hz, H-8'), 8.07 (d, 1H,  $J = 7.4$  Hz, H-5). Dopo rimozione del gruppo *tert*butile il corrispondente (3*S*,3'*R*)-3-(idrossimetil) spiro [diidropirazina- 2,5-dione-6,3'-(2',3'-dihydrothieno[2,3-*b*]nafto-4',9'-dione)] (**10a**) è ottenuto come un solido giallo (91%); fp 239-241 °C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  3.59 (d, 1H,  $J = 12.6$  Hz, H-2'b), 3.60-3.63 (m, 1H), 3.84-3.86 (m, 1H), 4.01 (d,

1H, H-2'a), 4.20-4.23 (m, 1H, H-3), 7.77-7.82 (m, 2H, H-6' e H-7'), 8.04 (d, 1H,  $J = 7.4$  Hz, H-8'), 8.09 (d, 1H,  $J = 7.4$  Hz, H-5'); FAB-MS  $m/z$  calcolato per C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S 344.34, trovato 344.51.

**(3*S*,3'*S*)-3-[(*tert*-butilossi)metil]spiro[diidropirazina-2,5-dione-6,3'-(2',3'-diidrotieno[2,3-*b*]nafto-4',9'-dione)] (10'b):** FC in AcOEt; resa 26%; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.40 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 3.41 (d, 1H,  $J = 12.6$  Hz, H-2'b), 3.91-3.94 (m, 1H), 4.03-4.07 (m, 1H), 4.26-4.30 (m, 2H, H-2'a e H-3), 6.35 (s, 1H, NH), 6.38 (s, 1H, NH), 7.67-7.75 (m, 2H, H-6' e H-7'), 8.03 (d, 1H,  $J = 7.4$  Hz, H-8'), 8.08 (d, 1H,  $J = 7.4$  Hz, H-5'). Dopo la rimozione del gruppo *tert*-butile il corrispondente (3*S*,3'*S*)-3-(idrossimetil)spiro[diidropirazina-2,5-dione-6,3'-(2',3'-diidrotieno[2,3-*b*]nafto-4',9'-dione)] (**10b**) è ottenuto come un solido giallo (90%): fp 248-249 °C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>-OD)  $\delta$  3.60 (d, 1H,  $J = 12.6$  Hz, H-2'b), 3.74-3.76 (m, 1H), 4.00-4.03 (m, 1H), 4.11 (d, 1H, H-2'a), 4.16-4.19 (m, 1H, H-3), 7.77-7.83 (m, 2H, H-6' e H-7'), 8.04 (d, 1H,  $J = 7.4$  Hz, H-8'), 8.08 (d, 1H,  $J = 7.4$  Hz, H-5'); FAB-MS  $m/z$  calcolato per C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S 344.34, trovato 344.51.

**(3*R*,3'*R*)-3-[(trilitio) metil] spiro[diidropirazina-2,5-dione-6,3'-(2',3'-diidrotieno[2,3-*b*] nafto-4',9'-dione)] (11'a):** FC in AcOEt; resa 26%; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  2.79-2.89 (m, 2H), 3.26 (d, 1H,  $J = 12.6$  Hz, H-2'b), 3.98- 4.00 (m, 1H, H-3), 4.28 (d, 1H, H-2'a), 5.99 (s, 1H, NH), 6.54 (s, 1H, NH), 7.26-7.48 and 7.50-7.54 (m, 15H, aryl), 7.67-7.75 (m, 2H, H-6' e H-7'), 8.00 (d, 1H,  $J = 7.4$  Hz, H-8'), 8.05 (d, 1H,  $J = 7.4$  Hz, H-5'). In seguito alla rimozione del gruppo tritile il corrispondente (3*R*,3'*R*)-3-(mercaptometil) spiro [(diidropirazina-2,5-dione)-6,3'-(2',3'-diidrotieno[2,3-*b*]nafto-4',9'-dione)] (**11a**) è ottenuto come un solido giallo (80%): fp 181-183 °C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  3.11-3.15 (m, 2H), 3.64 (d, 1H,  $J = 12.6$  Hz, H-2'b), 4.23 (d, 1H, H-2'a), 4.34-4.36 (m, 1H, H-3), 7.77-7.83 (m, 2H, H-6' e H-7'), 8.05 (d, 1H,  $J = 7.4$  Hz, H-8'), 8.09 (d, 1H,  $J = 7.4$  Hz, H-5'); FAB-MS  $m/z$  calcolato per C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> 360.40, trovato 360.25.

**(3*R*,3'*S*)-3-[(trilitio)metil]spiro[diidropirazina- 2,5-dione-6,3'-(2',3'-diidrotieno[2,3-*b*]nafto-4',9'-dione)] (11'b):** FC in AcOEt; resa 20%; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3.07-

3.18 (m, 2H), 3.25 (d, 1H,  $J = 12.7$  Hz, H-2'b), 3.49- 3.52 (m, 1H, H-3), 4.18 (d, 1H, H-2'a), 6.22 (s, 1H, NH), 6.36 (s, 1H, NH), 7.20-7.538 (m, 15H, aryl), 7.66-7.73 (m, 2H, H-6' e H-7'), 8.00 (d, 1H,  $J = 7.4$  Hz, H-8'), 8.05 (d, 1H,  $J = 7.4$  Hz, H-5'). In seguito alla rimozione del gruppo tritile il corrispondente (3*R*,3'*S*)-3-(mercaptometil)spiro[(diidropirazina-2,5-dione)-6,3'-(2',3'-diidrotieno [2,3-*b*]nafto-4',9'-dione)] (11b) è ottenuto come un solido giallo (82%): fp 198-201 °C;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  3.14- 3.16 (m, 1H), 3.19-3.21 (m, 1H), 3.58 (d, 1H,  $J = 12.6$  Hz, H-2'b), 4.09 (d, 1H, H-2'a), 4.15-4.18 (m, 1H, H-3), 7.77- 7.83 (m, 2H, H-6' e H-7'), 8.05 (d, 1H,  $J = 7.4$  Hz, H-8'), 8.09 (d, 1H,  $J = 7.4$  Hz, H-5'); FAB-MS  $m/z$  calcolato per C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S 360.40, trovato 360.26.

**(3*S*,3'*R*)-3-[(metiltio)ethyl]spiro[diidropirazina-2,5-dione-6,3'-(2',3'-diidrotieno[2,3-*b*]nafto-4',9'-dione)] (12a):** FC in AcOEt; solido giallo (26%); fp 242-244 °C;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  2.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.26-2.29 (m, 2H), 2.64-2.74 (m, 2H), 3.28 (d, 1H,  $J = 12.9$  Hz, H-2'b), 4.40 (d, 1H, H-2'a), 4.54-4.60 (m, 1H, H-3), 6.40 (s, 1H, NH), 6.63 (s, 1H, NH), 7.69-7.73 (m, 2H, H-6' e H-7'), 8.00 (d, 1H,  $J = 7.4$  Hz, H-8'), 8.07 (d, 1H,  $J = 7.4$  Hz, H-5'); FAB-MS  $m/z$  calcolato per C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> 388.46, trovato 388.31.

**(3*S*,3'*S*)-3-[(metiltio) etil] spiro [diidropirazina-2,5-dione-6,3'-(2',3'-diidrotieno[2,3-*b*]nafto-4',9'-dione)] (12b):** FC in AcOEt; solido giallo (26%); fp 251-253 °C;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  2.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.36-2.40 (m, 2H), 2.71-2.76 (m, 2H), 3.31 (d, 1H,  $J = 12.8$  Hz, H-2'b), 4.12 (d, 1H, H-2'a), 4.28-4.32 (m, 1H, H-3), 6.45 (s, 1H, NH), 6.83 (s, 1H, NH), 7.70-7.76 (m, 2H, H-6' e H-7'), 8.01 (d, 1H,  $J = 7.4$  Hz, H-8'), 8.11 (d, 1H,  $J = 7.4$  Hz, H-5'); FAB-MS  $m/z$  calcolato per C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> 388.46, trovato 388.29.

**(3*S*,3'*R*)-3-[(*N*-(*tert*-butilossicarbonil) amino) butil] spiro [(diidropirazina-2,5-dione)-6,3'-(2',3'-diidrotieno[2,3-*b*]nafto-4',9'-dione)] (13'a):** FC in AcOEt; resa 22%;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.41 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 1.52-1.55 (m, 4H), 1.94-1.96 (m, 2H), 3.11-3.14 (m, 2H), 3.36 (d, 1H,  $J = 12.9$  Hz, H-2'b); 4.36 (d, 1H, H-2'a), 4.50-4.52 (m, 1H, H-3), 4.64 (s, 1H, NHBoc), 6.61 (s, 1H, NH), 6.85 (s, 1H, NH), 7.66-7.72 (m, 2H, H-6' e H-7'), 7.97 (d, 1H,  $J = 7.4$  Hz, H-8'), 8.05 (d, 1H,  $J = 7.4$  Hz, H-5'). In seguito alla rimozione

del gruppo protettore N-Boc il corrispondente (3*S*,3'*R*)-3-(aminobutil)spiro-[(diidropirazina-2,5-dione)-6,3'-(2',3'-diidrotieno[2,3-*b*]nafto-4',9'-dione)] trifluoroacetato (13a) è ottenuto come un solido giallo: fp 244-246 °C; ; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 1.02-1.07(m, 2H), 1.44-1.56 (m, 4H), 2.79-2.82 (m,2H), 3.47 (d, 1H, *J* = 12.6 Hz, H-2'*b*), 4.16 (d, 1H, H-2'*a*),4.50-4.52 (m, 1H, H-3), 7.76-7.79 (m, 2H, H-6' e H-7'), 8.01(d, 1H, *J* = 7.4 Hz, H-8'), 8.05 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz, H-5'); FABMS*m/z* calcolato per C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>SaTFA 499.10, trovato 499.14.

**(3*S*,3'*S*)-3-[(*N*-(*tert*-butilossicarbonile)amino)butil]-spiro [(diidropirazina-2,5-dione)-6,3'-(2',3'-diidrotieno[2,3-*b*]nafto-4',9'-dione)] (13'*b*):** FC in AcOEt; resa 20%; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.40 (s, 9H, *CH*<sub>3</sub>), 1.99-2.04 (m, 2H),2.16-2.23 (m, 2H), 3.11-3.15 (m, 2H), 3.19-3.21 (m,2H), 3.39 (d, 1H, *J* = 12.9 Hz, H-2'*b*), 4.14-4.16 (m, 1H,H-3), 4.20 (d, 1H, H-2'*a*), 4. 84 (s, 1H, *NHBoc*), 6.72 (s, 1H, *NH*),6.88 (s, 1H, *NH*), 7.66-7.73 (m, 2H, H-6' e H-7'), 8.01 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz, H-8'), 8.06 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz, H-5'). In seguito a rimozione del gruppo N-Boc (3*S*,3'*S*)-3-(aminobutil)spiro-[(diidropirazina-2,5-dione)-6,3'-(2',3'-diidrotieno[2,3-*b*]nafto-4',9'-dione)] trifluoroacetato (13b) è quantitativamente ottenuto come un solido giallo: fp 251-253 °C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 1.02-1.07 (m, 2H), 1.44-1.56 (m, 4H), 2.79-2.82 (m,2H), 3.47 (d, 1H, *J* = 12.6 Hz, H-2'*b*), 4.16 (d, 1H, H-2'*a*), 4.50-4.52 (m, 1H, H-3), 7.76-7.79 (m, 2H, H-6' e H-7'), 8.01 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz, H-8'), 8.05 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz, H-5'); FAB-MS *m/z* calcolato per C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>SaTFA 499.10, trovato 499.27

**(3*S*,3'*R*) -3- [(1-tritil-1H-imidazolo-4-yl) metil] spiro [diidropirazina-2,5-dione-6,3'-(2',3'-diidrotieno [2,3-*b*]nafto-4',9'-dione)] (14'*a*):** FC in AcOEt; resa 20%; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.86-2.93 (m, 1H), 3.27 (d, 1H, *J* = 12.8 Hz, H-2'*b*), 3.32-3.35 (m, 1H), 4.41 (d, 1H, H-2'*a*), 4.69-4.71 (m, 1H, H-3), 6.63 (s, 1H, *NH*), 6.70 (s, 1H, *NH*), 7.02-7.35 (m, 15H, aryl), 7.40 (s, 1H, imidazole), 7.66-7.73 (m, 2H, H-6', H-7'), 7.98 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz, H-8'), 8.06 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz, H-5'), 8.23 (s, 1H, imidazol). Dopo la rimozione del gruppo tritile il corrispondente (3*S*,3'*R*) -3- (1H-imidazolo-4-yl- metil) spiro [diidropirazina-2,5-dione-6,3'-(2',3'-diidrotieno [2,3-*b*] nafto-4',9'-dione)] (14a) è ottenuto come un solido giallo: fp 259-261 °C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3.08-3.14 (m,

2H), 3.57 (d, 1H, J = 12.6 Hz, H-2'b), 3.921 (d, 1H, H-2'a), 4.40-4.41 (m, 1H, H-3), 7.20 (s, 1H, imidazole), 7.83-7.86 (m, 2H, H-6' e H-7'), 8.01 (d, 1H, J = 7.5 Hz, H-8'), 8.04 (d, 1H, J = 7.4 Hz, H-5'), 8.61 (s, 1H, imidazole), 8.92 (s, 1H, NH), 9.00 (s, 1H, NH); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 2.96 (d, 1H, J = 12.8 Hz, H-2'b), 3.14-3.19 (m, 1H), 3.27-3.30 (m, 1H), 3.89 (d, 1H, H-2'a), 4.56-4.60 (m, 1H, H-3), 7.20 (s, 1H, imidazole), 7.68- 7.72 (m, 2H, H-6', H-7'), 7.92 (d, 1H, J = 7.3 Hz, H-8'), 7.97 (d, 1H, J = 7.3 Hz, H-5'), 8.37 (s, 1H, imidazole); FAB-MS m/z calcolato per C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S 394.41, trovato 394.53.

**(3S,3'S)-3-[(1-tritil-1H-imidazol-4-yl)metil]spiro-[diidropirazina-2,5-dione-6,3'-(2',3'-diidrotieno[2,3-b]nafto-4',9'-dione)] (14'b):** FC in AcOEt; resa 20%; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.10-3.13 (m, 1H), 3.19-3.23 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.38 (d, 1H, J 0 12.8 Hz, H-2'b), 4.24 (d, 1H, H-2'a), 4.38-4.41(m, 1H, H-3), 6.61 (s, 1H, NH), 6.65 (s, 1H, NH), 7.02-7.35 (m, 15H, aryl), 7.39 (s, 1H, imidazole), 7.61-7.63 (t, 1H, J = 7.4 Hz, H-6'), 7.68-7.70 (t, 1H, J 0 7.4 Hz, H-7'), 7.94-7.98 (m, 2H, H-8' e H-5'), 8.27 (s, 1H, imidazole). Dopo rimozione del gruppo tritile il corrispondente (3S,3'S)-3-(1H-imidazolo-4-yl-metil)spiro-[diidropirazina-2,5-dione-6,3'-(2',3' '-diidrotieno[2,3-b]nafto- 4',9'-dione)] (**14b**) è ottenuto come un solido giallo: fp 265-268 °C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 2.94-2.97 (m, 1H), 3.10-3.13 (m, 1H), 3.68 (d, 1H, J = 12.6 Hz, H-2'b), 3.82 (d, 1H, H-2'a), 4.18-4.20 (m, 1H, H-3), 6.96 (s, 1H, imidazole), 7.83-7.86 (m, 2H, H-6' e H-7'), 8.03 (d, 1H, J = 7.5 Hz, H-8'), 8.06 (d, 1H, J = 7.4 Hz, H-5'), 8.42 (s, 1H, imidazole), 8.91(s, 1H, NH), 8.94(s, 1H, NH); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 3.10 (d, 1H, J = 12.8 Hz, H-2'b), 3.19-3.23 (m, 1H), 3.29-3.32 (m, 1H), 3.38 (d, 1H, H-2'a), 4.40-4.43 (m, 1H, H-3), 7.28 (s, 1H, imidazole), 7.69-7.74 (m, 2H, H-6', H-7'), 7.91 (d, 1H, J = 7.4 Hz, H-8'), 7.97 (d, 1H, J = 7.4 Hz, H-5'), 8.35 (s, 1H, imidazole); FAB-MS m/z calcolato per C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S 394.41, trovato 394.53.

***3-(2'-Cloro)acetammide-3-etossicarbonil-2,3-diidrotieno[2,3-b]nafto-4,9-dione (2).***

Una miscela di 3-amino- 3-etossicarbonil -2,3- diidrotieno [2,3-b]nafto-4,9-dione, (303 mg, 1 mmol), cloroacetil cloruro (1.2 eq) e TEA (2.2 eq), sono 1h. La soluzione è stata portata a secco e ridisciolta in DCM e lavata successivamente con H<sub>2</sub>O per eliminare i sali, e con una soluzione di acido citrico al 10% (2 x 25 ml). Il tutto viene infine anidrificato con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e state disciolte in THF tenuta in agitazione a temperatura ambiente per portato a secco. Il prodotto grezzo, viene purificato utilizzando una colonna cromatografia, adoperando come eluente cloroformio.

Solido giallo (89%) mp. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 3.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.36 (d, 1H, H-2, *J*= 12.8 Hz), 4.05 (d, 1H, CH<sub>2</sub>, *J*= 17.7 Hz), 4.45 (d, 1H, CH<sub>2</sub>), 4.46 (d, 1H, 2-H), 6.81 (s, 1H, NH), 7.73-7.77 (m, 2H, 6-H and 7-H), 8.00 (d, 1H, 8-H), 8.10 (d, 1H, 5-H). MS [M<sup>+</sup>] calcd for C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>5</sub>Cl: 379.03, found: 379.12.

***Metodo generale per la sintesi dei derivati 4-4-alchil (alchilsostituiti) spiro [(diidropiperazinic-2,5-dione)-6,3'-(2',3'-diidrotieno [2,3-b] nafto 4',9'-dione)]***

Ad una soluzione di 3-(cloroacetil)amino-3-etossicarbonil-2,3-diidrotieno[2,3-b]nafto-4,9-dione (150 mg, 0.4 mmol), in THF, viene aggiunta, la corrispondente ammina (1.1eq): metilamina, N-Boc etilendiamina, N-Boc-propildiamina, N,N-dimetiletilamina, N,N-dimetilpropilamina, 3-(imidazol)propilamina, 2-(piperidin)etilamina, 2-(pirrolidin)etilamina e TEA (0,3mL, 2 mmol). La soluzione viene portata a secco, ridisciolta in MeOH e TEA fino a pH=8 e messo a refluxo. Dopo 1-5 h, la miscela viene portata a secco, ridisciolta in H<sub>2</sub>O/DCM e neutralizzata con soluzione di HCl 1N. La fase organica viene successivamente lavata con H<sub>2</sub>O (2x25 ml) per eliminare i sali, anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e portata a secco. I prodotti ciclici sono stato purificato con una cromatografia flash (FC) utilizzando come eluente un gradiente di 0-20% MeOH in DCM, ottenendo così tutti i derivati spirodichetopiperaziici.

***Metodo generale per la rimozione dei gruppi protettori delle catene laterali.***

La soluzione di derivati protetti in catena laterale (0.03-0.05 mM) in diclorometano (10 ml) è trattata con acido trifluoroacetico (2 ml) e tenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 1-3 ore. Dopo evaporazione del solvente, i residui sono trattati con diclorometano ed



etere di etilico, con la formazione dei corrispondenti composti finali. La purificazione di tutti questi composti è ottenuta tramite HPLC, microanalisi, e spettroscopia NMR.

#### **Risoluzione degli enantiomeri (+)1 and (-)1 .**

La DTNQ (1 mmol) è stata disciolta in (3/1) DCM/DMF (20 ml) e alla soluzione sono state aggiunte successivamente Boc-Phe (1 eq), HBTU (1.2 eq), HOBT (1.2 eq) e DIEA (2eq) e tenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 48 h. Allontanati i solventi, il residuo è stato disciolto in CHCl<sub>3</sub>, lavato successivamente con una soluzione di acido citrico al 10% (2 x 25 ml), NaHCO<sub>3</sub> al 10% (2 x 25 ml), H<sub>2</sub>O (25 ml), anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e portata a secco. Cromatografia flash del residuo con un gradiente del 20-50% di EtOAc in n-Esano ha permesso la separazione dei diastereoisomeri in ordine decrescente di R<sub>f</sub> 3-(*tert*Butossicarbonil-*L*-Fenilalaninal) amino-3-etossicarbonil-(2,3)-diidrotieno-[2,3-*b*]nafto-4,9-dione (6a e b). La rimozione del gruppo protettore Boc- è stata ottenuta per trattamento con TFA in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a temperatura ambiente per 2 h. Dopo evaporazione del solvente, i residui sono trattati con diclorometano ed etere di etilico, con la formazione dei corrispondenti composti enantiomericamente puri 3-(*L*-Fenilalanil)amino-3-etossicarbonil-(2,3)-diidrotieno[2,3-*b*] nafto-4,9-dione, che vengono trattati con fenilisotiocianato in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, a refluxo per 1h per ottenere i derivati tioureidici (+)7a e (-)7b. La rimozione del derivato tioidantoinico è stata ottenuta per trattamento con TFA in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a temperatura ambiente per 2 h. Dopo evaporazione del solvente, i residui sono trattati con diclorometano ed etere di etilico, con la formazione dei corrispondenti composti enantiomericamente puri del DTNQ (+)1 e (-)1.

#### **4-metilspiro[(diidropiperazinici-2,5-dione)-6,3'-(2',3'-diidrotieno[2,3-*b*]nafto-4',9'-**

**dione)] 4a** Solido giallo (54%), mp. 190-191. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 3.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.36 (d, 1H, 2'-H, *J* = 12.8 Hz), 4.04 (d, 1H, 3-Ha, *J* = 17.7 Hz), 4.45 (d, 1H, 3-Hb), 4.46 (d, 1H, 2'-H), 6.81 (s, 1H, NH), 7.73-7.77 (m, 2H, 6'-H and 7'-H), 8.00 (d, 1H, 8'-H), 8.10 (d, 1H, 5-H ). MS [M<sup>+</sup>] calc per C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S: 314.04, trovato 314.61.

**4-[(2-N,N-dimetil)amino]etilspiro[(diidropirazin-2,5-dione)-6,3'-(2',3'-diidrotieno[2,3-*b*]nafto-4',9'-dione)] cloridrato 4f** Solido giallo (51%), mp.219-222. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz,

CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ , 2.83-2.85 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.97 (s, 6H, N-CH<sub>3</sub>), 3.43-3.46 (d, 1H, 2'-H,  $J$  = 12.5 Hz), 3.79-3.83 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.06-4.09 (d, 1H, 2'-H), 6.40 (s, 1H, NH), 7.72-7.75 (m, 2H, 6-H and 7-H), 7.98-8.00 (d, 1H, 8-H), 8.10-8.12 (d, 1H, 5-H ). MS [M<sup>+</sup>] calc per C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S.HCl: 407.59, trovato 407.91.

**4-(2-ammino)etilspiro[(diidropirazin-2,5-dione)-6,3'-(2',3'-diidrotieno[2,3-*b*] naphtho-4',9'-dione)] trifluoroacetato 4e.** Solido giallo (48%), mp. 174-176. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ , 3.05-3.08 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.37 (d, 1H, 2'-Ha,  $J$  = 12.8 Hz); 3.44-3.47 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 3.85-3.89 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 4.09 (d, 1H, 3-Ha,  $J$  = 17.7 Hz); 4.51 (d, 1H, 2'-Hb); 4.56 (d, 1H, 3-Hb); 7.07 (s, 1H, NH); 7.73-7.77 (m, 2H, 6'-H and 7'-H); 8.00 (d, 1H, 8'-H); 8.09 (d, 1H, 5'-H ). MS [M<sup>+</sup>] calc per C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S.CF<sub>3</sub>COO: 457.06, trovato: 458.10.

**4-(2-Piperidin)etil-spiro[(diidropirazin-2,5-dione)-6,3'-(2',3'-diidrotieno[2,3-*b*] nafto-4',9'-dione)] cloridrato 4h.** Solido giallo (50%), mp. 238-240. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ , 1.58-1.63 (m, 6H, CH<sub>2</sub>); 2.30-2.33 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3.05-3.09 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3.35 (d, 1H, 2'-Ha,  $J$  = 12.8 Hz); 3.51-3.54 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 3.69-3.71 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 4.01 (d, 1H, 3-Ha,  $J$  = 17.7 Hz); 4.43 (d, 1H, 2'-Hb); 4.51 (d, 1H, 3-Hb); 7.30 (s, 1H, NH); 7.70-7.74 (m, 2H, 6'-H and 7'-H); 7.96 (d, 1H, 8'-H); 8.06 (d, 1H, 5'-H ). MS [M<sup>+</sup>] calc per C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S.HCl: 421.61, trovato: 422.42.

**4-(2-Pirrolidin)etil-spiro[(diidropirazin-2,5-dione)-6,3'-(2',3'-diidrotieno[2,3-*b*] naftho-4',9'-dione)] cloridrato 4g.** Solido giallo (50%), mp. 238-240. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ , 1.60-1.64(m, 4H, CH<sub>2</sub>); 2.72-2.76 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3.05-3.06 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3.41 (d, 1H, 2'-Ha,  $J$  = 12.8 Hz); 3.62-3.64 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 3.79-3.81 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 4.20 (d, 1H, 3-Ha,  $J$  = 17.7 Hz); 4.42 (d, 1H, 2'-Hb); 4.49 (d, 1H, 3-Hb); 6.81 (s, 1H, NH); 7.74-7.79 (m, 2H, 6'-H and 7'-H); 8.00 (d, 1H, 8'-H); 8.09 (d, 1H, 5'-H ). MS [M<sup>+</sup>] calc.per C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S.HCl: 421.61, trovato: 422.42.

### **Riduzione di $\alpha$ -amminoacidi N-protetti**

#### *Procedura generale*

2 mmoli di  $\alpha$ -amminoacido N-protetto sono sciolti in THF, posti sotto agitazione a temperatura di  $-15^{\circ}\text{C}$ , si aggiunge alla soluzione 1 equivalente di N-Metil-Morfolina e si aggiunge goccia a goccia 1 equivalente di etilcloroformiato, la miscela di reazione viene lasciata sotto agitazione per 1 ora. Il prodotto di reazione viene filtrato. La soluzione risultante viene di nuovo messa sotto agitazione a temperatura di  $-15^{\circ}\text{C}$  aggiungendo una soluzione acquosa di  $\text{NaBH}_4$  (3 equivalenti) lasciandola sotto agitazione per 1-2 ore. Si porta a secco il solvente e si effettua un lavaggio cloroformio/acqua, si estrae la fase organica, si anidrifica con solfato di sodio anidro e si allontana il solvente.

### **Conversione di $\beta$ -amminoalcoli N-protetti in $\beta$ -Iodoammine N-protette**

#### *Procedura generale*

La sintesi procede utilizzando 1.1 equivalenti di trifenilfosfina e 1.5 equivalenti di iodio in DCM anidro sotto agitazione a refluxo sotto corrente di azoto per 15 minuti. Si aggiungono poi 1.5 equivalenti di imidazolo nel pallone e si lascia sotto agitazione per altri 15 minuti. Si aggiunge infine 1.5 mmoli di  $\beta$ -amminoalcol e si lascia sotto agitazione fino ad esaurimento del  $\beta$ -amminoalcol. La fase organica viene lavata con una soluzione al 10% di tiosolfato ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ), fino a che la soluzione non diventa limpida o leggermente gialla, poi con acqua fino a neutralità, si estrae la fase organica si anidrifica con solfato di sodio anidro e si porta a secco il solvente. Il  $\beta$ -amminioduro N-protetto viene purificato su colonna cromatografica, usando come fase mobile una miscela di N-Esano/Acetato di etile (3:2).

## **Reazione tra $\beta$ -iodoammine N-protette e $\alpha,\alpha$ -amminoesteri**

### *Procedura generale*

Ad una sospensione di 500 mg di setacci molecolari attivati anidro, viene aggiunto il carbonato di cesio (500 mg) e si lascia sotto agitazione per 10 minuti. Successivamente si aggiunge l' $\alpha,\alpha$ -amminoestere (0.5 equivalenti), dopo 30 minuti si aggiunge il  $\beta$ -amminioduro N-protetto (0.5 equ.) e si lascia sotto agitazione per 16 ore, la reazione viene monitorata attraverso una TLC e si purifica il prodotto su colonna cromatografia usando come miscela eluente N-Esano/Acetato di Etile.

Gli spettri  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR sono stati ottenuti con un spettrometro Bruker-500 operante a 500 MHz. I valori di chemical shifts sono riportati in  $\delta$  (ppm) utilizzando  $\text{Me}_4\text{Si}$  come riferimento interno ed i valori di  $J$  sono riportati in Hertz (Hz). I prodotti ottenuti dopo purificazione vengono analizzati con RP-HPLC analitico eseguita su colonne Vydac C-18 (25 $\times$ 0.46 cm), usando un rivelatore UV selezionato a 215 nm. L'eluizione è stata effettuata con gradiente lineare dal 10 al 60% di acetonitrile in TFA acquoso 0.1% per 55 min ad un velocità di flusso di 1 ml/min.

**Boc-L-Ala  $\psi$ [CH<sub>2</sub>NH] Phe-OMe** olio incolore  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  -19.96  $\delta_{\text{H}}$  7.28 (3H, m,  $\text{C}_6\text{H}_5$ -), 7.11 (2H, d,  $\text{C}_6\text{H}_5$ -), 5.20 (1H, d, NH), 4.65 (1H, m,  $\alpha$ -CH-Phe), 4.01 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 3.91 (1H, m,  $\alpha$ -CH-Ala), 3.72 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.12 (2H, m  $\beta$ -CH<sub>2</sub>-Phe), 1.13 (3H, d, -CH<sub>3</sub>) 1.43 (9H, s, CH<sub>3</sub>Boc).

**Boc-L-Phe  $\psi$ [CH<sub>2</sub>N] ProOMe** olio incolore  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  -32.92  $\delta_{\text{H}}$  7.33-7.22 (5H, m,  $\text{C}_6\text{H}_5$ -), 4.81 (1H, m, NH), 4.37 (1H, m,  $\alpha$ -CH-Phe), 4.07 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 4.01 (1H, m,  $\alpha$ -CH-Pro), 3.77 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.55 (2H, m,  $\delta$ -CH<sub>2</sub>-Pro), 2.81 (2H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>-Phe), 2.29-1.94 (4H, m,  $\beta$ - $\gamma$  CH<sub>2</sub>Pro), 1.42 (9H, s, CH<sub>3</sub>Boc).

**Boc-L-Glu(OMe)  $\psi$ [CH<sub>2</sub>NH] Phe-OMe** olio incolore  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  -22.56  $\delta_{\text{H}}$  7.26 (3H, m,  $\text{C}_6\text{H}_5$ -), 7.01 (2H, d,  $\text{C}_6\text{H}_5$ -), 5.23 (1H, d, NH), 4.65 (1H, m,  $\alpha$ -CH-Phe), 4.62 (1H, m,  $\alpha$ -CH-Glu), 4.04 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 3.71 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.66 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.09 (2H, m,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>-Phe), 2.38 (2H, m,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub>-Glu), 1.84-1.62 (2H, m,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>-Glu), 1.43 (9H, s, CH<sub>3</sub>Boc).

**Boc-L-Pro  $\psi$ [CH<sub>2</sub>N] Pro-OBz** olio incolore  $[\alpha]^{20}_D$  -62.16  $\delta_H$  7.32 (5H, m, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-), 4.07 (2H, m, CH<sub>2</sub>NH), 4.57 ((1H, m,  $\alpha$ -CH-Pro), 3.58 (1H, m,  $\delta$ -CH-Pro), 2.29-1.94 (4H, m,  $\beta$ - $\gamma$  CH<sub>2</sub>Pro), 1.43 (9H, s, CH<sub>3</sub>Boc).

**Z-L-Ala  $\psi$ [CH<sub>2</sub>NH] Phe-OMe** olio incolore  $[\alpha]^{20}_D$  -1.4  $\delta_H$  7.34-7.176 (10H, m, Z, Phe) 5.05 (2H, s, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.40 (1H, dd,  $\alpha$ -CH-Phe), 3.91 (2H, m, CH<sub>2</sub>NH) 3.85 (1H, m,  $\alpha$ -CH-Ala), 3.67 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.11 (1H, dd,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>-Phe) 2.91 (1H, dd,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>-Phe) 2.22 (3H, d, -CH<sub>3</sub>).

**Z-L-Ala  $\psi$ [CH<sub>2</sub>N] Pro-OBz** olio incolore  $[\alpha]^{20}_D$  -15.12  $\delta_H$  7.40-7.29 (10H, m, Z, OBz), 5.24 (2H, dd, -OCH<sub>2</sub>-Ph), 4.57 ((1H, m,  $\alpha$ -CH-Pro), 4.06 (1H, m,  $\alpha$ -CH-Ala), 3.58 (1H, m,  $\delta$ -CH-Pro).

**Fmoc-L-Ala  $\psi$ [CH<sub>2</sub>NH] Phe-OMe** olio giallo pallido  $[\alpha]^{20}_D$  3.04  $\delta_H$  7.79 (2H, d, -Fmoc) 7.63 (2H, d, Fmoc), 7.38 (3H, t, Fmoc), 7.30 (3H, t, Fmoc), 7.18 (5H, m, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-), 4.40 (1H, m,  $\alpha$ -CH-Phe), 4.32 (2H, t, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.18 (1H, t, CHFmoc), 3.92 (2H, t, CH<sub>2</sub>NH), 3.85 (1H, m,  $\alpha$ -CH-Ala), 3.66 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.07 (1H, dd,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>-Phe), 2.89 (1H, dd,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>-Phe) 1.11 (3H, d, -CH<sub>3</sub>)

**Fmoc-D-Ala  $\psi$ [CH<sub>2</sub>NH] Phe-OMe** olio giallo pallido  $[\alpha]^{20}_D$  9.56  $\delta_H$  7.79 (2H, d, -Fmoc) 7.63 (2H, d, Fmoc), 7.38 (3H, t, Fmoc), 7.30 (3H, t, Fmoc), 7.18 (5H, m, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-), 4.39 (1H, m,  $\alpha$ -CH-Phe), 4.32 (2H, t, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.18 (1H, t, CHFmoc), 3.91 (2H, t, CH<sub>2</sub>NH), 3.84 (1H, m,  $\alpha$ -CH-Ala), 3.66 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.07 (1H, dd,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>-Phe), 2.89 (1H, dd,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>-Phe) 1.10 (3H, d, -CH<sub>3</sub>)

**Fmoc-L-Lys(Boc)  $\psi$ [CH<sub>2</sub>NH] Phe-OMe** olio giallo pallido  $[\alpha]^{20}_D$  -12.88  $\delta_H$  7.80 (2H, d, -Fmoc), 7.63 (2H, d, Fmoc), 7.39 (3H, t, Fmoc), 7.30 (3H, t, Fmoc), 7.19-7.14 (5H, m, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-), 4.39 (1H, m,  $\alpha$ -CH-Phe), 4.39(2H, t, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.19 (1H, t, CHFmoc), 3.94 ((2H, m, CH<sub>2</sub>NH), 3.73 (1H, m,  $\alpha$ -CH-Lys), 3.66 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.03

(1H, m,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>-Phe) 3.01(2H, m,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>-Lys), 2.88 (1H, m,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>-Phe) 1.43 (9H, s, CH<sub>3</sub>Boc) 1.45-1.30 (4H, m,  $\beta$ - $\gamma$  CH<sub>2</sub> Lys).

### **Sintesi dei frammenti A, B, C e D del peptide $\beta$ -amiloide**

Il peptide A è stato assemblato su supporto solido usando la classica procedura peptidica, a temperatura ambiente, *via-Fmoc* (N-Fluorenilmetossi- carbonile) utilizzando una resina Wang.

0,5 g di resina Wang (con grado di sostituzione di 0.7 mmol/g) viene lasciata rigonfiare in 30 ml di DMF (dimetilformammide). L'accoppiamento del primo amminoacido (N <sup>$\alpha$</sup> Fmoc-Ala-OH), così come quello dei successivi amminoacidi (N <sup>$\alpha$</sup> Fmoc-Ile-OH, N <sup>$\alpha$</sup> Fmoc-Ile-OH, N <sup>$\alpha$</sup> Fmoc-Gly-OH, N <sup>$\alpha$</sup> Fmoc-Leu-OH, N <sup>$\alpha$</sup> Fmoc-Met-OH, N <sup>$\alpha$</sup> Fmoc-Val-OH e N <sup>$\alpha$</sup> Fmoc-Gly-OH, N <sup>$\alpha$</sup> Fmoc-Gly-OH, N <sup>$\alpha$</sup> Fmoc-Val-OH, N <sup>$\alpha$</sup> Fmoc-Val-OH, N <sup>$\alpha$</sup> Fmoc-Ile-OH) è stato effettuato usando un eccesso di amminoacido pari a 3 volte il grado di sostituzione della resina in presenza di HBTU/HOBt (3 eq.) e di DIEA (6 eq.).

Il gruppo N <sup>$\alpha$</sup> -Fmoc è stato rimosso mediante trattamento del peptide legato alla resina con una soluzione al 25% di piperidina in DMF (1x50 mL, 5 min, 1x50 mL, 20 min). I peptidi sono stati quindi lavati più volte con DMF (3x50 mL), DCM (3x50 mL). Il procedimento è stato condotto fino alla completezza della sintesi.

Le sequenze amminoacidiche sono state così assemblate alternando cicli di deprotezione e cicli di accoppiamento.

Il Kaiser test è stato effettuato dopo ogni accoppiamento, per determinarne la completezza e dopo ogni deprotezione per verificare la totale rimozione del gruppo protettore N <sup>$\alpha$</sup> -Fmoc.

I peptidi B, C e D sono stati assemblati su supporto solido usando la classica procedura peptidica, a temperatura ambiente, *via-Fmoc* (N-Fluorenilmetossi- carbonile) utilizzando una resina Sasrin.

0,5 g di resina Sasrin (con grado di sostituzione di 0.7 mmol/g) viene lasciata rigonfiare in 30 ml di DMF (dimetilformammide). L'accoppiamento del primo amminoacido (N <sup>$\alpha$</sup> Fmoc-Gly-OH per il frammento B, amminoacido (N <sup>$\alpha$</sup> Fmoc-Phe-OH per il frammento C, amminoacido (N <sup>$\alpha$</sup> Fmoc-Gly-OH per il frammento D), così come quello dei successivi amminoacidi (N <sup>$\alpha$</sup> Fmoc-Lys(Boc)-OH, N <sup>$\alpha$</sup> Fmoc-Asn(Trt)-OH, N <sup>$\alpha$</sup> Fmoc-Ser(tBu)-OH,

N<sup>α</sup>Fmoc-Gly-OH, N<sup>α</sup>Fmoc-Val-OH, N<sup>α</sup>Fmoc-Asp(OtBu)-OH e N<sup>α</sup>Fmoc-Glu(OtBu)-OH, N<sup>α</sup>Fmoc-Ala-OH N<sup>α</sup>Fmoc-Phe-OH, per il frammento B; N<sup>α</sup>Fmoc-Val-OH, N<sup>α</sup>Fmoc-Lys(Boc)-OH, N<sup>α</sup>Fmoc-Gln(Trt)-OH, N<sup>α</sup>Fmoc-His(Trt)-OH, N<sup>α</sup>Fmoc-His(Trt)-OH, N<sup>α</sup>Fmoc-Val-OH e N<sup>α</sup>Fmoc-Glu(OtBu)-OH, N<sup>α</sup>Fmoc-Tyr(tBu)-OH, per il frammento C; N<sup>α</sup>Fmoc-Ser(tBu)-OH, N<sup>α</sup>Fmoc-Asp(OtBu)-OH, N<sup>α</sup>Fmoc-His(Trt)-OH, N<sup>α</sup>Fmoc-Gly-OH, N<sup>α</sup>Fmoc-Val-OH, N<sup>α</sup>Fmoc-Asp(OtBu)-OH e N<sup>α</sup>Fmoc-Glu(OtBu)-OH, e N<sup>α</sup>Fmoc-Glu(OtBu)-OH, N<sup>α</sup>Fmoc-Ala-OH, N<sup>α</sup>Fmoc-Asp(OtBu)-OH per il frammento D) è stato effettuato usando un eccesso di amminoacido pari a 3 volte il grado di sostituzione della resina in presenza di HBTU/HOBt (3 eq.) e di DIEA (6 eq.).

Il gruppo N<sup>α</sup>-Fmoc è stato rimosso mediante trattamento del peptide legato alla resina con una soluzione al 25% di piperidina in DMF (1x50 mL, 5 min, 1x50 mL, 20 min). I peptidi sono stati quindi lavati più volte con DMF (3x50 mL), DCM (3x50 mL). Il procedimento è stato condotto fino alla completezza della sintesi.

Le sequenze amminoacidiche sono state così assemblate alternando cicli di deprotezione e cicli di accoppiamento.

Il Kaiser test è stato effettuato dopo ogni accoppiamento, per determinarne la completezza e dopo ogni deprotezione per verificare la totale rimozione del gruppo protettore N<sup>α</sup>-Fmoc. Il distacco del peptide finale dalla resina senza la rimozione dei gruppi protettori in catena laterale è stata effettuata utilizzando una miscela di TFA (acido trifluoroacetico), in DCM all'1%.

Infine, la resina è stata rimossa dalla soluzione mediante filtrazione e il peptide grezzo è stato recuperato attraverso precipitazione in etere etilico a freddo ottenendo un precipitato bianco.

Successivamente il peptide è stato purificato mediante HPLC preparativo su colonna C-18 a fase inversa (Vydac 218TP1010, 1.0x25 cm) ed eluita con un gradiente lineare di acetonitrile in acqua con 0,1% di acido trifluoroacetico (v/v). La purificazione è stata monitorata a 280 nm e le frazioni corrispondenti al picco di maggiore entità sono state raccolte, combinate e liofilizzate per dare un prodotto finale puro (>98%) come polvere bianca (resa: 80%). Il grado di purezza finale è stato controllato mediante HPLC analitico della Shimadzu usando una colonna C<sub>18</sub> Vydac 218TP104 e applicando un gradiente da 10% a 90% acetonitrile in acqua con l'aggiunta di 0.1% di TFA nel tempo di 40 min ad

un flusso di 2 mL per min. Tutti i peptidi, infine, sono stati caratterizzati mediante FAB-MS ed analisi degli aminoacidi.

### **Sintesi del peptide $\beta$ -amiloide**

Il *coupling* tra il peptide B ed il peptide A, ancorato sulla resina Wang, è stato effettuato in presenza di HBTU/HOBt (3 eq.) e di DIEA (6 eq.) con l'ausilio delle microonde con una potenza 250W ed una temperatura 60°C.

Il gruppo  $N^{\alpha}$ -Fmoc è stato rimosso mediante trattamento del peptide legato alla resina con una soluzione al 25% di piperidina in DMF (1x50 mL, 5 min, 1x50 mL, 20 min). I peptidi sono stati quindi lavati più volte con DMF (3x50 mL), DCM (3x50 mL). Il procedimento è stato condotto allo stesso modo anche per i frammenti C e D, fino a completezza della sintesi del peptide  $\beta$ -amiloide [1-42].

Il distacco del peptide finale dalla resina con contemporanea rimozione dei gruppi protettori in catena laterale è stata effettuata utilizzando una miscela di TFA/TES/H<sub>2</sub>O (99.5/0.25/0.25%).

Infine, la resina è stata rimossa dalla soluzione mediante filtrazione e il peptide grezzo è stato recuperato attraverso precipitazione in etere etilico a freddo ottenendo un precipitato bianco. Successivamente il peptide è stato purificato mediante HPLC preparativo su colonna C-4 a fase inversa (Vydac, 1.0x25 cm) ed eluita con un gradiente lineare di acetonitrile in acqua con 0,1% di acido trifluoroacetico (v/v). La purificazione è stata monitorata a 280 nm e le frazioni corrispondenti al picco di maggiore entità sono state raccolte, combinate e liofilizzate per dare un prodotto finale puro (>98%) come polvere bianca (resa: 40%). Il grado di purezza finale è stato controllato mediante HPLC analitico della Shimadzu usando una colonna C-4 a fase inversa (Vydac, 1.0x25 cm) e applicando un gradiente da 10% a 90% acetonitrile in acqua con l'aggiunta di 0.1% di TFA nel tempo di 40 min ad un flusso di 2 mL per min. L'analisi di spettrometria di massa del grezzo e del prodotto finale è stato effettuato mediante MALDI-TOF, i campioni sono stati miscelati con  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid come matrice ed analizzati utilizzando uno strumento Bruker BIFLEX in modo lineare a 19.5 kV.



## **7.BIBLIOGRAFIA**

1. Gedye, R. *et al.* The use of microwave ovens for rapid organic synthesis. *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 279–282.
2. Kappe, C. O. & Stadler, A. *Microwaves in Organic and Medicinal Chemistry*, **2005** Wiley-VCH, Weinheim.
3. Tierney, J. P. & Lidström, P. (eds) *Microwave Assisted Organic Synthesis*, **2005** Blackwell, Oxford
4. Hayes, B. L. *Microwave Synthesis: Chemistry at the Speed of Light* **2002**, CEM Publishing, Matthews.
5. Kappe, C. O. Controlled microwave heating in modern organic synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 6250–6284.
6. Baghurst, D. R. & Mingos, D. M. P. Application of microwave dielectric heating effects to synthetic problems in chemistry. *Chem. Soc. Rev.*, **1991**, 20, 1–47.
7. Gabriel, C., Gabriel, S., Grant, E. H., Halstead, B. S. & Mingos, D. M. P. Dielectric parameters relevant to microwave dielectric heating. *Chem. Soc. Rev.*, **1998**, 27, 213–223.
8. Gronnow, M. J., White, R. J., Clark, J. H. & Macquarrie, D. J. Energy efficiency in chemical reactions: a comparative study of different reaction techniques. *Org. Process Res. Dev.*, **2005**, 9, 516–518.
9. Perreux, L. & Loupy, A. A tentative rationalization of microwave effects in organic synthesis according to the reaction medium, and mechanistic considerations. *Tetrahedron*, **2001**, 57, 9199–9223 ().
10. De La Hoz, A., Diaz-Ortiz, A. & Moreno, A. Microwaves in organic synthesis. Thermal and nonthermal microwave effects. *Chem. Soc. Rev.*, **2005**, 34, 164–178.
11. Giguere, R. J., Bray, T. L., Duncan, S. M. & Majetich, G. Application of commercial microwave ovens to organic synthesis. *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 4945–4958.
12. Kappe, C. O. and Dallinger D. The impact of microwave synthesis on drug discovery *Nature Review*, **2006**, 5, 52-64.
13. Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics* 11/e **2005**, 1313-1319

14. De Vita, V. T.; Hellman, S.; Rosenberg, S. A. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 6th ed.; Lippincott, Williams and Wilkins: Philadelphia, PA, 2001.
15. Lown, J. W. Anthracycline and Anthraquinone Anticancer Agents: Current Status and Recent Developments. *Pharmacol. Ther.* **1993**, *60*, 185–214.
16. Binaschi, M.; Bigioni, M.; Cipolline, A.; Rossi, C.; Goso, C.; Maggi, C. A.; Capranico, G.; Animati, F. Anthracyclines: Selected New Developments. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* **2001**, *1*, 113–130.
17. Krishna, R.; Mayer, L. D. Multidrug Resistance (MDR) in Cancer. Mechanisms, Reversal Using Modulators of MDR and the Role of MDR Modulators in Influencing the Pharmacokinetics of Anticancer Drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, *11*, 265–83.
18. Baird, R. D.; Kaye, S. B. Drug Resistance Reversals Are We Getting Closer. *Eur. J. Cancer* **2003**, *39*, 2450–2461.
19. Minotti, G.; Menna, P.; Salvatorelli, E.; Cairo, G.; Gianni, L. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* **2004**, *56*, 185–229.
20. Serrano, J.; Palmeira, C. M.; Kuehl, D. W.; Wallace, K. B. Cardiosensitive and Cumulative Oxidation of Mitochondrial DNA Following Subchronic Doxorubicin Administration. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1411*, 201–205.
21. Gomez-Monterrey, I.; Campiglia, P.; Mazzoni, O.; Novellino, E.; Diurno, M. V. Cycloaddition Reactions of Thiazolidine Derivatives. An Approach to the Synthesis of New Functionalized Heterocyclic Systems. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5755–5757.
22. Gomez-Monterrey, I.; Campiglia, P.; Grieco, P.; Diurno, M. V.; Bolognese, A.; La Colla, P.; Novellino, E. New Benzo[g]isoquinoline-5,10-diones and Dihydrothieno[2,3-*b*]naphtho-4,9-dione Derivatives: Synthesis and Biological Evaluation as Potential Antitumoral Agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 3769–3775.
23. Gomez-Monterrey, I.; Santelli, G.; Campiglia, P.; Califano, D.; Falasconi, F.; Pisano, C.; Vesci, L.; Lama, T.; Grieco, P.; Novellino, E. Cytotoxic Evaluation of

24. Gomez-Monterrey, I.; Campiglia, P.; Carotenuto, A.; Califano, D.; Pisano, C.; Vesci, L.; Lama, T.; Bertamino, A.; Sala, M.; Mazzella di Bosco, A.; Grieco, P.; Novellino, E. Design, Synthesis, and Cytotoxic Evaluation of a New Series of 3-Substituted Spiro[(dihydropyrazine-2,5-dione)-6,3'-(2',3'-dihydrothieno[2,3-*b*]naphtho-4',9'-dione)] Derivatives. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1787–1798.
25. Gomez-Monterrey, I.; Campiglia, P.; Carotenuto, A.; Stiuso, P.; Bertamino, A.; Sala, M.; Aquino, C.; Grieco, P.; Morello, S.; Pinto, A.; Ianelli, P.; and Novellino E., Spiro[(dihydropyrazin-2,5-dione)-6,3'-(2',3'-dihydrothieno[2,3-*b*]naphtho-4',9'-dione)]-Based Cytotoxic Agents: Structure–Activity Relationship Studies on the Substituent at N4-Position of the Diketopiperazine Domain *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2924–2932
26. Rittle, K. E.; Evans, B. E.; Bock, M. G.; Di Pardo, R. M.; Whitter, W. L.; Homnick, C. F.; Veber, D. F.; Freidinger, R. M. A New Amine Resolution Method and Its Application to 3-Amino Benzodiazepines. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 521–522.
27. Jenner, J.; Meyer, B. H.; Bachman, P.; Ernst, R. R. Investigation of Exchange Processes by Two-Dimensional NMR Spectroscopy. *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 4546–4553.
28. (a) Pinto, M.; Robine-Leon, S.; Appay, M. D.; Keding, M.; Triadou, N.; Dussaulx, E.; Lacroix, B.; Simon-Assman, P.; Haffen, K.; Fogh, J.; Zweibaum, A. Enterocyte-like Differentiation and Polarization of the Human Colon Carcinoma Cell Line CaCo-2 in Culture. *Biol. Cell* **1983**, *47*, 323–330. (b) Engle, M. J.; Goetz, G. S.; Alpers, D. H. CaCo-2 Cells Express a Combination of Colonocyte and Enterocyte Phenotypes. *J. Cell. Physiol.* **1998**, *174*, 362–369.
29. Yam, C. H.; Fung, T. K.; Poon, R. Y. C. Cyclin A in Cell Cycle Control and Cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *59*, 1317–1326.
30. Krieger, D. T., *Science*, **1983**, *222*, 975–985
31. Marshall, G. R., *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 3547–3558
32. Ramachandran, G. N.; Sasikharan, V., *Adv. Protein Chem.* **1968**, *23*, 283

33. Adzhubei, A. A., Eisenmenger, F., Tumanyan, V. G., Esipova, N. G., *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **1987**, 5, 689-704
34. Valle, G., Kazmierski, K.M., Hruby, V.J., *Int. J. Pept. Protein. Res.* **1992**, 40, 222
35. Kessler, H. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1982**, 21, 512–523
36. Ball, J.B. & Alewwod, P.F. Conformational constraints: nonpeptide beta-turn mimics. *J. Mol. Res.* **1990**, 2, 55–64.
37. Kahn, M. Peptide secondary structure mimetics: recent advances and future challenger. *Synlett* **1993**, 11, 821–826.
38. Haubner, R., Finsinger, D. & Kessler, H. Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrin for a new cancer therapy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997** 36, 1374–1389.
39. Chou, P.Y. & Fasman, G.D. ()  $\beta$ -Turns in proteins. *J. Mol. Biol.* **1977**. 115, 135–175.
40. Stanfield, R.L., Fieser, T.M., Lerner, R.A. & Wilson, I.A. Crystal structures of an antibody to a peptide and its complex with peptide antigen at 2.8 Å. *Science* **1990** 248, 712–719.
41. Plucinska, K., Kataoka, T., Yodo, M., Cody, W.L., He, J.X., Humblet, C., Lu, G.H., Lunney, E. & Major, T.C. Multiple binding modes for the receptor-bound conformations of cyclic AII agonists. *J. Med. Chem.* **1993** 36, 1902–1913.
42. Nikiforovich, G.V. & Marshall, G.R. Three dimensional recognition requirements for angiotensin agonists: a novel solution for an old problem. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, 195, 222–228.
43. Kyle, D.J., Blake, P.R., Smithwick, D., Green, L.M., Martin, J.A., Sinsko, J.A. & Summers, M.F. NMR and computational evidence that high-affinity bradykinin receptor antagonists adopt C-terminal beta-turns. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 1450–1460.
44. Hruby, V.J. Prospects for peptidomimetic drug design. *Drug Discov. Today* **1997** 2, 165–167.
45. Ball, J.B., Hughes, R.A., Alewood, P.F. & Andrews, P.R. b-Turn topography. *Tetrahedron* **1993** 49, 3467–3478.

46. Freidinger, R.M. Computer graphics and chemical synthesis in the study of conformation of biologically active peptides. In: *Peptides: Synthesis-Structure-Function* (Rich, D.H. & Gross, E., eds), **1981** pp. 673–683. Pierce Chemical Company, Rockford, IL, USA.
47. Kemp, D.S. & Stites, W.E. () A convenient preparation of derivatives of 3(S)-amino-10(R)-carboxy-1,6-diazacyclodeca- 2,7-dione. The dilactam of L- $\alpha$ , $\epsilon$ -diaminobutyric acid and D-glutamic acid: a b-turn template. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 5057–5060.
48. Hanessian, S., McNaughton-Smith, G., Lombart, H.-G. & Lubell, W.D Design and synthesis of conformationally constrained aminoacids as versatile scaffolds and peptide mimetics. Tetrahedron report number 426. *Tetrahedron* **1997**, 53, 12789–12854.
49. Freidinger, R.M., Veber, D.F., Perlow, D.S., Brooks, J.R. & Saperstein, R. Bioactive conformation of luteinizing hormone-releasing hormone: evidence from a conformationally constrained analog. *Science* **1980**, 210, 656–658.
50. Freidinger, R.M., Perlow, D.S. & Veber, D.F. Protected lactam-bridged dipeptides for use as conformational constraints in peptides. *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 104–109.
51. Freidinger, R.M. Synthesis of  $\gamma$ -lactam- constrained tryptophyllsine derivatives. *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 3631–3633.
52. Schuster, M. & Blechert, S. Olefin metathesis in organic chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997** 36, 2036–2056.
53. Furstner, A. Olefin metathesis and beyond. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000** 39, 3013–3043.
54. Armstrong, S.K. Ring closing diene metathesis in organic synthesis. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1998**, 1, 371–388.
55. Yanagisawa, H., Ishihara, S., Ando, A., Kanazaki, T., Miyamoto, S., Koike, H., Iijima, Y., Oizumi, K., Matsushita, Y. & Hata, T. Angiotensin-converting enzyme inhibitors: 2. Perhydroazepin-2-one derivatives. *J. Med. Chem* **1988**. 31, 422–428.
56. Evans, P.A., Collins, I., Hamley, P., Holmes, A.B., Raithby, P.R. & Russell, K. Regio- and stereoselective functionalisation of monocyclic medium ring lactams. *Tetrahedron Lett.* **1992** 33, 6859–6862.

57. Robl, J.A., Cimarusti, M.P., Simpkins, L.M., Weller, H.N., Pan, Y.Y., Malley, M. & DiMarco, J.D. Peptidomimetic synthesis: a novel, highly stereoselective route to substituted Freidinger lactams. *JACS* **1994** 116, 2348–2355.
58. Piscopio, A.D., Miller, J.F. & Koch, K. Ring closing metathesis in organic synthesis: evolution of a high speed, solidphase method for the preparation of b-turn mimetics. *Tetrahedron* **1999** 55, 8189–8198.
59. Campiglia, P., Gomez-Monterrey, I., Longobardo, L., Lama, T., Novellino, E. & Grieco, P. An efficient approach for monosulphide bridge formation in solidphase peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2004** 45, 1453–1456 and references cited inside.
60. T. Lama, P. Campiglia, A. Carotenuto, L. Auriemma, I. Gomez-Monterrey, E. Novellino and P. Grieco A novel route to synthesize Freidinger lactams by microwave irradiation *J. Peptide Res.* **2005**, 66, 231–235
61. Spatola, A.F., in *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, Weinstein, Ed., Dekker, New York, **1983**, 7, 267
62. (a) Graham, S. L.; de Solms, S. J.; Giuliani, E. A.; Kohl, N. E.; Mosser, S. D.; Oliff, A. I.; Pompliano, D. L.; Rands, E.; Breslin, M. J.; Deana, A. A.; Garsky, V. M.; Scholz, T. H.; Gibbs, J. B.; Smith, R. L. *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 725–732; (b) Gaudron, S.; Grillon, C.; Thierry, J.; Riches, A.; Wierenga, P. K.; Wdzieczak-Bakala, J. *J. Stem Cells* **1999**, 17, 100–106.
63. (a) Martinez, J.; Bali, J.-P.; Rodriguez, M.; Castro, B.; Magous, R.; Laur, J.; Lignon, M.-F. *J. Med. Chem.* **1985**, 28, 1874–1879; (b) Coy, D. H.; Heinz-Erian, P.; Jiang, N. Y.; Sasaki, Y.; Taylor, J.; Moreau, J.-P.; Wolfrey, W. T.; Gardner, J. D.; Jensen, R. T. *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 5056–5060; (c) Hocart, S. J.; Murphy, W. A.; Coy, D. H. *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 1954–1958; (d) Doulut, S.; Rodriguez, M.; Lugrin, D.; Vecchini, F.; Kitabgi, P.; Aumelas, A.; Martinez, J. *Pept. Res.* **1992**, 5, 30–38; (e) Meyer, J.-P.; Davis, P.; Lee, K. B.; Porreca, F.; Yamamura, H. I.; Hruby, V. J. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 3462–3468.
64. (a) Stemmer, C.; Quesnel, A.; Prevost-Blondel, A.; Zimmermann, C.; Muller, S.; Briand, J. P.; Pircher, H. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 5550–5556; (b) Calbo, S.; Guichard, G.; Muller, S.; Kourilsky, P.; Briand, J. P.; Abastado, J. P. *J.*

65. Haaime, G.; Lohse, A.; Buchardt, O.; Nielsen, P. E. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1996**, 35, 1939–1942.
66. Sasaki, Y.; Coy, D. *Peptides* **1987**, 8, 119–121.
67. Dueholm, K. L.; Egholm, M.; Buchardt, O. *Org. Prep. Proced. Int.* **1993**, 25, 457–462.
68. Lin, S.; Hanzlik, R. P. *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 1067–1075.
69. Mancuso, A. J.; Swern, D. *Synthesis* **1981**, 3, 165–184.
70. (a) Fehrentz, J.-A.; Castro, B. *Synthesis* **1983**, 676–678; (b) Meyer, J.-P.; Davis, P.; Lee, K. B.; Porreca, F.; Yamamura, H.; Hruby, V. J. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 3462–3468.
71. (a) Lubell, W. L.; Rapoport, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 236–239; (b) Coy, D. H.; Hocart, S. J. *Tetrahedron* **1988**, 44, 835–838.
72. Campiglia, P.; Aquino, C.; Bertamino, A.; Sala, M.; Gomez-Monterrey, I. M.; Novellino, E.; Grieco, P., Novel route in the synthesis of  $\psi$  [CH<sub>2</sub>NH] amide bond surrogate *Tetrahedron Letters* **2008**, 49, 731-734.
73. (a) Caputo, R.; Cassano, E.; Longobardo, L.; Palumbo, G. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 167–169; (b) Caputo, R.; Cassano, E.; Longobardo, L.; Palumbo, G. *Tetrahedron* **1995**, 51, 12337–12350.
74. Salvatore, R. N.; Nagle, A. S.; Schmidt, S. E.; Jung, K. W. *Org. Lett.* 1999, 1, 1893–1896.
75. Cushman, M.; Oh, Y.; Copeland, T. D.; Oroszlan, S.; Snyder, S. W. *J. Org. Chem.* 1991, 56, 4161–4167.
76. Merrifield, R.B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149
77. (a) Lloyd, D.H., Petrie, G.M., Noble, R.L., and Tam, J.P. Increased coupling efficiency in solid phase peptide synthesis using elevated temperature, *Peptides: Chemistry, Structure and Biology, Proceedings of the 11th American Peptide Symposium*, **1990** Escom, Leiden, Netherlands, 909-910,.(b) Kates, S.A.; Solé, N.A.; Beyermann, M.; Barany, G.; Albericio, F.; *Peptide Research*, **1996**, 9, 106.



78. Jonathan M. Collins, Michael J. Collins, Rebecca C. Steorts CEM Corporation  
Novel Method for Solid Phase Peptide Synthesis Using Microwave Energy  
Presented at *American Peptide Symposium* Boston, MA **2003**, 22 July
79. Hardy, J, and Selkoe, D J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **2002**;297: 353-6.
80. Wong, P C, Cai, H, Borchelt, D R, and Price, D L. Genetically engineered mouse models of neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci* **2002**;5: 633-9.
81. Jarrett, J T, Berger, E P, and Lansbury, P T, Jr. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 1993;32: 4693-7.
82. Mochizuki, A, Tamaoka, A, Shimohata, A, Komatsuzaki, Y, and Shoji, S. Abeta42-positive non-pyramidal neurons around amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Lancet* 2000;355: 42-3.
83. Emilien, G, Beyreuther, K, Masters, C L, and Maloteaux, J M. Prospects for pharmacological intervention in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2000;57: 454-9.
84. Temussi, P.A., Masino, L. and Pastore A., *The EMBO Journal*, **2003** Vol.22 N.3, 355-361
85. Emilien, G, Beyreuther, K, Masters, C L, and Maloteaux, J M. Prospects for pharmacological intervention in Alzheimer disease. *Arch Neurol* **2000**, 57: 454-9.
86. Zamani, M R, Allen, Y S, Owen, G P, and Gray, J A. Nicotine modulates the neurotoxic effect of beta-amyloid protein(25-35)) in hippocampal cultures. *Neuroreport* **1997**, 8: 513-7.
87. Hendrix, J.C. and Lansbury, P.T. Jr Synthesis of a Protected Peptide Corresponding to Residues 1-25 of the & Amyloid Protein of Alzheimer's Disease *J. Org. Chem.* **1992**, 57,3421-3426
88. Hendrix, J.C., Halverson, K., Lansbury, P.T. Jr A Convergent Synthesis of the Amyloid Protein of Alzheimer's Disease *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 7930-7931